

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÁMASO ÁNGEL RUBIO VARGAS

AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU EM
EXEMPLARES DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*),
MANTIDOS EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE LABORATÓRIO.

CURITIBA

2018

DÁMASO ÁNGEL RUBIO VARGAS

AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU EM
EXEMPLARES DE TILÁPIA DO NILO (*OREOCHROMIS NILOTICUS*),
MANTIDOS EM CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DE LABORATÓRIO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dra. Maritana Mela Prodocimo

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Vargas, Dámaso Ángel Rubio

Avaliação do risco de exposição da água do rio Iguaçu em
exemplares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), mantidos
em condições experimentais de laboratório. / Dámaso Ángel
Rubio Vargas. – Curitiba, 2018.

106 p.: il.

Orientador: Maritana Mela Prodocimo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular.

1. Iguaçu, Rio (PR) 2. Qualidade da água 3. *Oreochromis
niloticus* 4. Poluição ambiental 5. Biomarcadores I. Título II.
Prodocimo, Maritana Mela III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DÁMASO ÁNGEL RUBIO VARGAS** intitulada: **Avaliação do risco de exposição da água do rio Iguaçu em exemplares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), mantidos em condições experimentais de laboratório**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 08 de Março de 2018.


MARITANA MELA PRODOCIMO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



DANIEL BUSSOLARO

Avaliador Externo (IFPR)



IZONETE CRISTINA GUILOSKI

Avaliador Externo (UFPR)



*Á minha mãe que me deu a vida e guiou
meus passos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maritana Mela, por acreditar em mim e aceitar o desafio de me orientar, pelo empenho e dedicação nas diversas análises deste trabalho. Obrigada também pelo seu apoio e amizade que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado. Especialmente aos professores Francisco e Ciro pelas contribuições no decorrer do trabalho e pelos valiosos conhecimentos nas aulas de Docência.

À todos os amigos, pesquisadores e professores do Laboratório de Metabolismo Celular. Obrigado por trabalhar com vocês.

À minha família escolhida, meus amigos que longe ou perto são parte dos pilares que me mantiveram de pé, Paulo pai e filho, Laura, Licinio e família, Jean e todos os amigos do Brasil.

À minha família de sangue, os que foram apoio na distância durante os dois anos de trabalho forte.

“Em tempos de crise, só a imaginação é
mais importante que o conhecimento.”

Albert Einstein

RESUMO

A falta de um adequado sistema de tratamento de esgoto sanitário e os constantes efluentes lançados nos rios estão causando uma diminuição da qualidade da água e perda da biodiversidade. No caso do Rio Iguaçu, este vem sofrendo alterações antropogênicas que ultrapassam sua capacidade de autodepuração do Rio, sendo considerado o segundo Rio mais poluído do Brasil. Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar os efeitos da água do Rio Iguaçu na saúde de exemplares juvenis de tilápia (*Oreochromis niloticus*), assim como, projetar os efeitos da poluição a nível populacional da espécie. A coleta da água para a fase experimental foi realizada perto da confluência com o Rio Verde, no município de Araucária, Paraná. Duzentos e quatro exemplares juvenis foram expostos à água poluída em condições laboratoriais. A água foi testada na forma original sem diluição, e sob duas diferentes diluições (25 e 50%), além do grupo controle que recebeu água filtrada por meio de filtros de resina e carvão ativado. Após 72 dias, os peixes foram anestesiados com etil-éster-3-aminobenzoico (MS222) na concentração de 0,02%, seguido da coleta de sangue para análises de genotoxicidade, eutanásia por ruptura da medula espinhal e coleta das amostras biológicas (brânquias, fígado, músculo, cérebro e bile) para análises histopatológicas, de neurotoxicidade, de defesas antioxidantes, de presença de metalotioneínas e presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile. Os resultados demonstraram alterações histopatológicas no fígado e nas brânquias, alterações genotóxicas nos eritrócitos, diminuição da atividade acetilcolinesterásica, ativação das defesas antioxidantes no fígado, recrutamento de metais mediante as metalotioneínas e a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile nos peixes expostos à água do Rio Iguaçu. Estes resultados demonstram que estes animais foram submetidos às condições de estresse pela poluição. Recomendam-se estudos futuros que avaliem os riscos da água do Rio Iguaçu sobre outras espécies que habitam esse ecossistema, assim como estudos que foquem nas populações que consomem peixes oriundos desta região impactada, ambos com o intuito de atualizar a legislação vigente para os corpos de água superficiais.

Palavras-chave: Rio Iguaçu. Qualidade da água. *Oreochromis niloticus*
Poluição ambiental. Biomarcadores.

ABSTRACT

The lack of an adequate sanitary sewage treatment system and the constant effluents thrown into the rivers is causing a decrease in water quality and loss of biodiversity. In the case of the Iguaçu River, it has undergone anthropogenic changes that exceed the capacity of self-purification of the river, being considered the second most polluted river in Brazil. In this context, the present study sought to evaluate the effects of Iguaçu River water on the health of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as well as to project the effects of pollution at the population level of the species. The collection of water for the experimental phase was carried out near the confluence with the River Verde, in the municipality of Araucária, Paraná. Two hundred four juvenile specimens were exposed to polluted water under laboratory conditions. The water was tested in the original form without dilution, and under two different dilutions (25 and 50%), in addition to the control group that received filtered water through resin and activated carbon filters. After 72 days, fish were anesthetized with 0.02% ethyl-3-aminobenzoic acid, followed by blood collection for genotoxicity analysis, euthanasia by incision of the spinal cord and collection of biological samples (gills, liver, muscle, brain and bile) for histopathological, neurotoxicity, antioxidant defenses, presence of metallothionines and the presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in bile. The results showed histopathological alterations in liver and gills, genotoxic alteration in erythrocytes, reduction of acetylcholinesterase activity, activation of antioxidant defenses in the liver, recruitment of metals by metallothioneins and the presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in bile in fish exposed to Iguaçu River water. These results demonstrate that these animals were subjected to stress conditions due to pollution. Future studies are recommended to evaluate the risks of water from the Iguaçu River to other species that inhabit this ecosystem, as well as studies that focus on the populations that consume fish from this impacted region, both with the intention of updating the current legislation for the bodies of surface water.

Keywords: Iguaçu River. Water quality. *Oreochromis niloticus*. Environmental pollution. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TILÁPIA DO NILO, <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> L.	32
FIGURA 2 - DESENHO EXPERIMENTAL REALIZADO NA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. LABORATÓRIO DE BIOENSAIOS.	39
FIGURA 3 - MAPAS MOSTRANDO O BRASIL (A), ESTADO DO PARANÁ (B) E BACIA DO ALTO IGUAÇU NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.	40
FIGURA 4 – COLETA DE AMOSTRAS DE TECIDOS DOS PEIXES <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU E OS BIOMARCADORES UTILIZADOS PARA O ESTUDO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO.	41
FIGURA 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE BRÂNQUIAS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>	54
FIGURA 6 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA REGIÃO DO EPITÉLIO EM BRÂNQUIAS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>	55
FIGURA 7 - CORTES HISTOLÓGICOS DE FÍGADO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> CORADOS EM HEMATOXILINA E EOSINA.	56
FIGURA 8 - GRAU DE EXTENSÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS AVALIADAS NO FÍGADO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU, POR INDIVÍDUO.	58
FIGURA 9 - ÍNDICE HISTOPATOLÓGICOS OBSERVADOS NO FÍGADO DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS A VÁRIAS DILUIÇÕES DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU.	58
FIGURA 10 - BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> ..	59
FIGURA 11 - NÚMERO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES TOTAIS (AMNT) EM 2000 ERITRÓCITOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>	60
FIGURA 12 - ERITRÓCITOS DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU.	60
FIGURA 13 - ATIVIDADE DA COLINESTERASE EM <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS A DIFERENTES DILUIÇÕES ÁGUA DO RIO IGUAÇU.	62
FIGURA 14 - BIOMARCADORES HEPÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU.	64
FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS EM <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS A VÁRIAS DILUIÇÕES DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU.	65
FIGURA 16 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS DE 2 A 6 ANÉIS DE BILE DE <i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i> EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU.	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ANALISADAS NO FÍGADO DOS PEIXES OREOCHROMIS NILOTICUS EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU, COM SEUS RESPECTIVOS FATORES DE IMPORTÂNCIA.....	44
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES DE POLUENTES SELECIONADOS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO IGUAÇU DURANTE O PERÍODO EXPERIMENTAL (METAIS, ORGANOCLORADOS (OC) E HIDROGENOCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAs)).....	52
TABELA 3 - VALORES DOS ÍNDICES DE CRESCIMENTO DE OREOCHROMIS NILOTICUS EXPOSTOS À ÁGUA DO RIO IGUAÇU.....	53
TABELA 4 - FREQUÊNCIAS RELATIVAS E MÉDIAS DE GRAU DE EXTENSÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS AVALIADAS NO FÍGADO DE OREOCHROMIS NILOTICUS EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS À VÁRIAS DILUIÇÕES DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU.....	57
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS RELATIVAS DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES AVALIADAS NOS ERITRÓCITOS DE OREOCHROMIS NILOTICUS EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS À VÁRIAS DILUIÇÕES DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU.....	61

LISTA DE SIGLAS

δ-ALAd	– Ácido delta-aminolevulínico desidratase
AChE	– Acetilcolinesterase
ANOVA	– Análise de Variância
CAT	– Catalase
CONAMA	– Conselho Nacional de Meio Ambiente
DBP	– de inglês <i>di – n – butyl phthalate</i>
DDT	– Diclorodifeniltricloroetano
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	– Ácido Ditionitrobenzóico
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	– Espécies reativas de oxigênio
FOX	– do inglês <i>Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method</i>
GSH	– Glutathiona reduzida
GSSG	– Glutathiona oxidada
GST	– Glutathiona-S-transferase
HCB	– Hexaclorobenzeno
HPAs	– Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IAP	– Instituto Ambiental do Paraná
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL1	– Interleucina 1
IL6	– Interleucina 6
LPO	– Lipoperoxidação
MT	– Metalotioneínas
NADPH	– do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
OCs	– Organoclorados
PBDEs	– Éteres de difenila polibromados
PCBs	– Bifenilos policlorados
PCO	– Proteínas carboniladas
PKC	– do inglês <i>Protein Kinase C</i>
POCs	– Pesticidas organoclorados
TNFα	– do inglês Tumor Necrosis Factor alpha
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
VEGF	– do inglês Vascular Endothelial Growth Factor

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag	– Prata
Al	– Alumínio
Cd	– Cádmio
Co	– Cobalto
Cu	– Cobre
Cys	– Cisteína
Fe	– Ferro
Hg	– Mercúrio
His	– Histidina
K	– Potássio
Lys	– Lisina
Mn	– Manganês
Na	– Sódio
Ni	– Níquel
P	– Fósforo
Pb	– Chumbo
Pd	– Paládio
SH	– Grupo Tiol
Ti	– Titânio
Zn	– Zinco
Zr	– Estrôncio

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	POLUENTES AMBIENTAIS	18
1.2	ECOTOXICOLOGIA.....	21
1.3	BIOMARCADORES	22
1.3.1	Biomarcadores somáticos.....	24
1.3.2	Biomarcadores Histopatológicos.....	25
1.3.3	Biomarcadores de genotoxicidade	25
1.3.4	Biomarcador de neurotoxicidade	26
1.3.5	Biomarcadores de estresse oxidativo.....	27
1.3.6	Biomarcador de exposição aos metais: metalotioneínas.....	29
1.3.7	Biomarcador de metabolismo de HPAs.....	30
1.4	BIOINDICADORES.....	30
1.4.1	Oreochromis niloticus	31
1.5	ÁREA DE ESTUDO	32
1.5.1	Rio Iguaçu	32
2.	JUSTIFICATIVA.....	36
3.	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
4.2	COMITÊ DE ÉTICA	39
4.3	COLETA DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU	39
4.4	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
4.5	ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU	41
4.6	BIOMARCADORES SOMÁTICOS	42
4.7	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	43
4.8	ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE	44
4.8.1	Ensaio cometa	44
4.8.2	Teste de micronúcleos e alterações nucleares	45
4.9	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	45
4.9.1	Quantificação protéica.....	45
4.9.2	Análise de neurotoxicidade - Acetilcolinesterase (AChE).....	46

4.9.3	Análises de biomarcadores de estresse oxidativo	46
4.9.3.1	Atividade da Catalase	47
4.9.3.2	Atividade da Glutathione S-Transferase (GST).....	47
4.9.3.3	Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)	48
4.9.3.4	Peroxidação lipídica	48
4.9.3.5	Carbonilação de Proteínas (PCO).....	49
4.10	Quantificação de metalotioneínas.....	49
4.11	ANÁLISES DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM BILE	51
4.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	51
5.	RESULTADOS.....	52
5.1	ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU	52
5.2	BIOMARCADORES SOMÁTICOS.....	53
5.3	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	53
5.3.1	Microscopia eletrônica de varredura das brânquias	53
5.3.2	Avaliação histopatológica do fígado.....	56
5.4	ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE	59
5.4.1	Ensaio Cometa em eritrócitos.....	59
5.4.2	Contagem de micronúcleos em eritrócitos.....	60
5.5	ANÁLISES DE NEUROTOXICIDADE	61
5.6	BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	62
5.7	QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEINAS	64
5.8	ANÁLISES HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM BILE.....	65
6.	DISCUSSÃO	67
7.	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO

O mundo moderno tem se desenvolvido com a visão de que os recursos naturais são infinitos. Esta corrente de pensamento, desenvolvida, sobretudo, após os anos 40, tem provocado um consumo indiscriminado destes recursos, com a premissa do progresso e crescimento ilimitado da sociedade, acreditando que o desenvolvimento tecnológico possa conduzir a uma igualdade social através da produção de bens materiais (BRESSER-PEREIRA, 2014).

Embora diversos estudos tenham demonstrado os grandes custos ambientais que este modelo de desenvolvimento provocou (MACH; MASTRANDEA, 2014; BAER; SINGER, 2016), o uso abusivo dos recursos naturais para o crescimento econômico e tecnológico, tem gerado uma correlação entre o momento evolutivo humano atual e os riscos de degradação ambiental. Por essa razão surgiram nestas últimas décadas correntes de pensamento como a agroecologia, o ecologismo, conservacionismo, ambientalismo moderado e o humanismo crítico (ALTIERI *et al.*, 1999; TORRES; PRADO, 2014) para tentar conciliar o desenvolvimento social e econômico com a preservação do meio ambiente. Todas estas correntes visam estabelecer uma relação entre a sociedade e o desenvolvimento sustentável.

A água é um dos recursos naturais mais abundantes no nosso Planeta. Existe cerca de 1.265.000 trilhões de m³ na superfície terrestre, deste, 97% estão distribuídos entre mares e oceanos, 2% em calotas polares e somente 1% em rios, lagos, águas subterrâneas e córregos (KELLER; BOTKIN, 2014), representando uma fração muito pequena a ser utilizável pela humanidade.

Pelas suas qualidades químicas, físicas e biológicas a água torna-se um recurso fundamental para o desenvolvimento de todas as formas de vida do Planeta, assim como para o sustento das atividades econômicas (agricultura, produção industrial e geração energética) e sociais (alimentação, saúde e higiene). Portanto, deveria ser considerada vital para o desenvolvimento sustentável das próximas gerações (FERREIRA DA CRUZ; PIRES; MARQUES, 2015).

O aumento das emissões de poluentes no ecossistema aquático resulta em comprometimento da “qualidade” das bacias hidrológicas, afetando também a população que dessa água depende. Além disso, muitos dos poluentes persistentes podem ser bioacumulados nos organismos deste ecossistema, sobretudo, naqueles que estão no topo da cadeia alimentar (BARBEE; GANIO; SWEARER, 2014).

É preciso lembrar que a maioria dos contaminantes químicos presentes em águas subterrâneas e superficiais estão relacionados às fontes industriais, agrícolas e domésticas. Esta variedade de contaminantes é enorme, com destaque para os agrotóxicos, compostos orgânicos voláteis e metais, muitos destes, apresentando riscos para o equilíbrio da fauna e da flora aquática, mas, sobretudo, riscos à saúde humana via uso público da água, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre a qualidade de água e as inúmeras enfermidades que acometem a saúde humana (LIBÂNIO; CHERNICHARO; NASCIMENTO, 2005; SEMENZA *et al.*, 2016).

O Brasil é um dos exemplos icônicos, pois embora possua 15% das reservas mundiais de água doce, as mesmas estão comprometidas pelo crescimento da população e das atividades industriais, levando a um aumento da demanda de água potável e também da sua poluição (NOVOTNY, 1999; SCHWARZENBACH *et al.*, 2010).

O país conta com duas das maiores bacias hidrográficas do planeta (Amazonas e Paraná). Estas são afetadas pelo crescente desenvolvimento econômico baseado nos complexos industriais e fazendas agrícolas; assim como pelo aumento da população urbana, as quais carecem de adequado planejamento do manejo de resíduos que são lançados praticamente sem tratamento nestes ecossistemas. Segundo a Associação Brasileira de Entidades do Meio Ambiente (ABEMA), cerca de 80% dos esgotos do país não recebem qualquer tipo de tratamento, sendo lançados diretamente em mares, rios, lagos e mananciais (NEVES *et al.*, 2015)

1.1 POLUENTES AMBIENTAIS

Atualmente 133 milhões de substâncias químicas são conhecidas e registradas formalmente, (CAS, 2017). Em grande escala são produzidos aproximadamente 3000 compostos por ano, os quais correspondem a algo em torno de 500 toneladas. A maioria dessas substâncias constituem potenciais ameaças para os seres vivos e para o meio ambiente devido à falta de pesquisas sobre os seus reais efeitos, sendo denominados poluentes emergentes. Os poluentes emergentes são os novos contaminantes ambientais, especialmente dos corpos hídricos estando presentes no nosso dia-a-dia (SAUVÉ; DESROSIERS, 2014), como por exemplo: fármacos e produtos de sua metabolização, lançados nas excretas ou por descarte indevido de medicamentos vencidos (VALCÁRCEL *et al.*, 2011; BELLAN *et al.*, 2012); produtos da higiene pessoal como fragrâncias, repelentes de insetos (MCEACHRAN *et al.*, 2016; RELIĆ *et al.*, 2017) e cafeína (MCEACHRAN *et al.*, 2016) os fármacos, produtos de higiene. Além disso, outra fonte dos poluentes emergentes são os esgotos domésticos com tratamento inadequado (VULLIET; CREN-OLIVÉ, 2011), aditivos industriais, aditivos de gasolina, retardadores de chama, pesticidas e hormônios (INOUE-CHOI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; MCEACHRAN *et al.*, 2016). Os poluentes emergentes chegam aos corpos hídricos com concentrações na ordem dos ng/L (PETRIE; BARDEN; KASPRZYK-HORDERN, 2015).

O maior problema está no fato de que estes poluentes podem entrar na cadeia alimentar e serem bioacumulados nos diferentes níveis celulares, podendo atuar no sistema endócrino alterando parte das respostas hormonais do corpo (YAMAMOTO *et al.*, 2016) podendo causar alterações fisiológicas, bioquímicas e histológicas (CORSOLINI; POZO; CHRISTIANSEN, 2016).

Os metais pesados são os poluentes mais encontrados em águas poluídas pela atividade industrial (WIENS, 2001; SILVA, 2015), sendo que muitos destes não são considerados elementos fisiológicos, como: Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Prata (Ag) e Titânio (Ti). Estudos sinalizam que alguns metais provocam aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por inibição dos mecanismos de proteção antioxidante

(BUSSOLARO; NETO; RIBEIRO, 2010; RAMSDORF, 2011). Por outro lado, demonstram que podem afetar o sistema locomotor (VÁZQUEZ; RODRÍGUEZ; LÓPEZ GRECO, 2003) e sensorial (MELA *et al.*, 2010; MELA *et al.*, 2012). Geralmente os metais pesados ligam-se facilmente a moléculas orgânicas (WILLIAMS, 1981) e acabam interagindo com a estrutura e funções de proteínas, ácidos nucleicos e moléculas energéticas (RAMSDORF, 2011), competindo com cátions essenciais (VALLE; ULMER, 1972). Também foram observadas alterações morfológicas severas durante o desenvolvimento embrionário e eclosão de larvas como também uma alta mortalidade em estágios larval e pós-larval (HARRIS; SANTOS, 2000).

Dentre as substâncias orgânicas mais citadas como poluentes em ecossistemas aquáticos estão os herbicidas e inseticidas, principalmente organofosforados e organoclorados. Estudos afirmam, mediante achados histopatológicos, que substâncias organofosforadas provocam necrose hepática (SILVA DE ASSIS *et al.*, 2013; ARIAS *et al.*, 2007), e também atividade anticolinesterásica (GAITONDE *et al.*, 2006). Outros organofosforados, segundo RUDNICKI (2004), ocasionam descolamento epitelial, hiperplasia, fusão e aneurisma em brânquias. O DDT, um inseticida organoclorado, diminui a viabilidade celular e provoca a redução da concentração da glutathione reduzida (GSH) e da atividade da enzima Ácido delta-aminolevulínico desidratase (δ -ALAd) (BUSSOLARO; NETO; RIBEIRO, 2010).

O crescimento industrial tem aumentado a presença das substâncias derivadas do petróleo nos corpos hídricos, entre eles, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Moléculas que geralmente contêm dois ou mais anéis aromáticos de seis carbonos fusionados. Estas substâncias apresentam baixa solubilidade na água, tendo caráter lipofílico, entrando facilmente no organismo pelo contato físico (ABDEL-SHAIFY; MANSOUR, 2016).

Segundo sua origem, os HPAs podem ser biogênicos, o seja, produto dos processos metabólicos de organismos como plantas e térmitas (por exemplo: naftaleno e perileno) e também pela degradação da matéria orgânica em condições aeróbias e anaeróbias produzindo principalmente compostos de quatro, cinco e seis anéis, precursores do húmus (WILCKE *et al.*, 2005;

WILCKE, 2007). Os HPAs petrogênicos são derivados do petróleo e seus principais compostos incluem homólogos aos naftalenos, fluorenos, fenantrenos, dibenzotiofenos e crisenos (JOHNSEN; KARLSON, 2007). Os HPAs pirogênicos são produto da combustão incompleta de material orgânico, incluídos: hidrocarbonetos e carvão mineral. Predominam os compostos aromáticos de três e cinco anéis, como o antraceno, fenantreno, pireno e o benzo(a)pireno. A combustão de materiais orgânicos se reconhece como a fonte principal de HPAs no ambiente (CRAM; ORTIZ; PAÉZ, 2004).

A maior parte dos HPAs presentes no meio aquático ficam relativamente perto dos pontos da sua origem, e suas concentrações geralmente diminuem logaritmicamente com o aumento da distância do seu ponto de origem (GARCIA-MARTINEZ, 2005). Como os HPAs são menos sensíveis à fotodegradação na água do que no ar, esses compostos são mais persistentes no ambiente aquático. Os HPAs que entram na água geralmente adsorvem rapidamente na matéria particulada e são depositados em grandes quantidades nos sedimentos do fundo. As concentrações relativas dos HPAs são geralmente maiores nos sedimentos, intermediários na biota aquática e menores na coluna de água (GARCÍA-MARTINEZ, 2005).

Também os HPAs têm registrado o aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Algumas moléculas podem reagir com NADPH e tióis oxidando estes doadores, diminuindo a quantidade de moléculas disponíveis para reduzir a formação de EROs (RAMSDORF, 2011; KUMAGAI; ABIKO; CONG, 2016).

Vários estudos demonstram que diferentes tipos dos compostos geram risco de carcinogênese (IPCS, 1998; MIZUKAWA, 2012; DE OLIVEIRA, 2013); assim como danos genéticos (CRAM; ORTIZ; PAÉZ, 2004) aos embriões, provocando defeitos congênitos e a diminuição do peso corporal, pois a sua estrutura permite atravessar a membrana placentária. Os produtos metabólicos derivados dessas moléculas (epóxidos) têm a capacidade de aderir-se a outras moléculas complexas como o DNA. Isso pode interferir na replicação do DNA gerando mudanças que permanecem na próxima geração (mutações). Estas mudanças podem provocar o crescimento celular descontrolado (câncer) ou danos embrionários.

1.2 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia é definida como a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008). A inserção dos ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes (LOMBARDI, 2004). A ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada principalmente na resposta de organismos individuais a estressores químicos.

Embora o conceito de ecotoxicologia seja amplo, abrangendo a totalidade do ecossistema, muito mais atenção tem sido dada aos efeitos em organismos individuais e poucos são os estudos com enfoque sistêmico. O nível de organismo situa-se no meio da escala hierárquica de resposta a estressores, integrando os níveis bioquímico, celular e fisiológico. Portanto, antes que os efeitos possam se expressar no nível de populações, comunidades e ecossistemas, a resposta de organismos individuais fornece uma boa avaliação do risco de alguns grupos de organismos susceptíveis (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008).

Os resultados das análises químicas por si só não retratam o impacto ambiental causado pelos poluentes porque não demonstram os efeitos sobre o ecossistema. Somente os sistemas biológicos (organismos ou partes deles) podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias (LOMBARDI, 2004). A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente. A determinação de substâncias isoladas através de análises químicas tradicionais, além de não detectarem os efeitos nos organismos, não dá resposta sobre que tipo de agente químico está sendo responsável pela toxicidade e informações sobre as possíveis interações entre substâncias (aditivas, antagônicas ou sinérgicas), como também da biodisponibilidade das mesmas (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008).

Os testes ecotoxicológicos, ou bioensaios, para monitoramento e avaliação da qualidade da água, têm se tornado bastante comum nos últimos anos no Brasil (ARIAS *et al.*, 2007; BUSSOLARO; NETO; RIBEIRO, 2010; ANDRADE BRITO *et al.*, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2016), pois permitem avaliar a contaminação ambiental por diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral, assim como, avaliar a resultante de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (DE OLIVEIRA, 2013; ABDEL-KHALEK, 2015; AMEUR *et al.*, 2015). Tem como vantagem, abranger uma grande variedade de substâncias biologicamente disponíveis em uma amostra ambiental através de um único ensaio, possibilitando a detecção de efeitos de substâncias tóxicas novas que possam surgir no ecossistema aquático (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008). A exposição a um agente tóxico pode ser aguda, quando a concentração letal do agente tóxico é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônica, quando o agente tóxico é liberado em eventos periodicamente repetidos, em concentrações subletais, durante um longo período de tempo (LOMBARDI, 2004).

A Ecotoxicologia é, portanto, uma ferramenta que pode ser utilizada antes ou após um evento de poluição ter ocorrido. Antes, para investigar os efeitos relativos da introdução de uma substância química isolada ou uma mistura de substâncias. Após, para avaliar o efeito adverso produzido no ambiente pela introdução de uma substância isolada ou uma mistura, considerando as interações químicas, físicas e biológicas com os fatores abióticos do ambiente (MAGALHAES; FERRAO-FILHO, 2008).

Finalmente os resultados provenientes dos estudos ecotoxicológicos podem ser empregados como instrumento de vigilância no acompanhamento contínuo das condições dos ecossistemas.

1.3 BIOMARCADORES

Biomarcadores são respostas bioquímicas, fisiológicas ou parâmetros morfológicos alterados, causados pela exposição de um organismo a um

determinado xenobionte (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; VIARENGO *et al.*, 2007; DALZUCHIO *et al.*, 2016). Os biomarcadores também podem ser definidos como alterações biológicas em níveis molecular, celular e fisiológico, as quais expressam a exposição e os efeitos tóxicos causados pelos poluentes (FASULO *et al.*, 2013; HOOK; GALLAGHER; BATLEY, 2014). Alguns critérios devem ser avaliados na definição de biomarcadores a serem utilizados em um estudo: especificidade, o biomarcador deve demonstrar o efeito específico de um determinado contaminante no funcionamento de um determinado órgão alvo e/ou de estrutura vital; fácil reprodutibilidade (metodologia e logística acessível) e ainda, clareza na interpretação dos resultados, de forma que seja possível diferenciar resultados devidos à exposição aos contaminantes de oscilações fisiológicas normais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Segundos os mesmos autores, os biomarcadores podem ser classificados em três classes distintas:

- **Biomarcadores de exposição:** Detectam e quantificam uma substância exógena ou seu metabólito e sua distribuição em um compartimento do organismo, estabelecendo uma relação entre a exposição externa e as concentrações internas. A bioacumulação de certos contaminantes ambientais persistentes nos tecidos animais pode ser considerada como um biomarcador da exposição a estes produtos químicos. A presença de metabolitos de HPAs na bile e metais nos diferentes tecidos como também as variações da concentração de metalotioneínas em sangue e órgãos são exemplos de biomarcadores de exposição.

- **Biomarcadores de efeito:** Incluem a quantificação de alterações bioquímicas, fisiológicas, ou outras respostas nos tecidos ou fluídos corporais de um organismo que podem ser associados a um possível ou estabelecido efeito adverso. A alteração na atividade de enzimas como a colinesterase e catalase é considerada um biomarcador de efeito.

- **Biomarcadores de susceptibilidade:** indicam a capacidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao desafio de exposição a uma substância xenobiótica específica, incluindo fatores genéticos e alterações nos receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo a essa exposição. O polimorfismo das diferentes enzimas que podem ser afetadas pelos

xenobióticos pode aumentar ou diminuir os efeitos destas substâncias sobre o organismo, pelo que a análise polimórfica das enzimas como a glutatona – s – transferase é considerada um exemplo de biomarcador de susceptibilidade.

A utilização de biomarcadores em estudos de toxicologia apresenta várias vantagens, pois permite: (1) detectar precocemente a existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, (2) identificar espécies ou populações em risco de contaminação, (3) avaliar a magnitude da contaminação, e (4) determinar o grau de severidade dos efeitos causados pelos contaminantes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

1.3.1 Biomarcadores somáticos

A medição de diferentes índices corporais é amplamente utilizada no estudo da condição de saúde de uma população. É uma ferramenta utilizada para a análise das interações entre os organismos e os fatores bióticos e abióticos do ambiente onde vivem, pois as alterações ambientais do ecossistema podem ser capazes de interferir no desenvolvimento do organismo (CAMARA; CARAMASCHI; PETRY, 2011).

O Fator de Condição (FC) relaciona o peso e o comprimento corporal, determinando o grau de bem-estar do organismo. Tanto a alimentação, contaminantes e saúde estão relacionadas com este índice (CAMARA; CARAMASCHI; PETRY, 2011). Por outro lado o Ganho de Peso, a Taxa de Crescimento Específico e a Taxa de Sobrevivência permitem avaliar as mudanças somáticas ao longo do período de tempo nos organismos e populações (DOS SANTOS *et al.*, 2007). Finalmente, o Índice Hepatossomático (IHS) permite a representação da massa do fígado em relação à massa corporal (TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2000). Sendo o fígado o principal órgão implicado na detoxificação no organismo, a mudança do IHS pode ser indicação de condições ambientais, como a exposição a poluentes, que causam distúrbios neste processo.

1.3.2 Biomarcadores histopatológicos

Análises histopatológicas são algumas das ferramentas mais utilizadas nos estudos de efeitos de poluentes em peixes, pois a exposição de órgãos-alvo diante condições ambientais de poluição podem causar alterações na sua histologia com diferentes graus de sensibilidade em relação as concentrações de contaminantes (RIBEIRO *et al.*, 2005; LUPI *et al.*, 2007; MELA *et al.*, 2013; PEREIRA; 2014).

Neste trabalho foram utilizados o fígado e as brânquias como órgãos para a investigação histopatológica de alterações ambientais, sendo ambos os alvos de poluentes ambientes (LUPI *et al.*, 2007; MELA *et al.*, 2013; KOSTIC *et al.*, 2017). As brânquias são os órgãos mais afetados pelo contato constante com a água, e também por apresentarem um tecido altamente vascularizado; seu epitélio é um excelente modelo para examinarmos os efeitos de substâncias dissolvidas na água, sendo altamente sensíveis aos fatores externos (RUDNIKI, 2004; LUPI *et al.*, 2007; KAUR; KAUR; KAUR, 2016). O fígado é um órgão-alvo importante por estar relacionado como os mecanismos de detoxificação e metabólicos (KAUD; EL-DAHSHAN, 2010; SILVA DE ASSIS, 2013) Assim, a condição histopatológica destes dois órgãos é considerada um bom indicador de qualidade da água (KAUD; EL-DAHSHAN, 2010; LIEBEL; TOMOTAKE; RIBEIRO, 2013; ABDEL-KHALEK, 2015; KOSTIĆ *et al.*, 2017).

1.3.3 Biomarcadores de genotoxicidade

Os biomarcadores genéticos são importantes para a detecção precoce dos efeitos da exposição do DNA nos organismos aquáticos aos xenobióticos. Algumas moléculas podem causar modificações na estrutura química do DNA que levam a morte celular, carcinogênese e modificações na frequência dos genes (IPCS, 1998; FERRARO *et al.*, 2004; GONZÁLEZ-MILLE *et al.*, 2010; RAMSDORF, 2011). O impacto de compostos tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA pode ser investigado por meio dos testes de Micronúcleo e Ensaio Cometa.

O teste de Micronúcleo permite a detecção e quantificação de pequenos núcleos (micronúcleos) ou cromossomos excluídos dos núcleos, formados como resultado dos danos causados por substâncias mutagênicas (HEDDLE, 1973; FERRARO *et al.*, 2004). Foi incorporada a este teste a avaliação das Alterações Morfológicas Nucleares (AMN) o qual aumenta a possibilidade de análise dos efeitos genotóxicos de substâncias químicas presentes na água. As alterações podem ser classificadas como *blebbed*, *notched*, *lobed* e *vacuolated*, segundo as alterações observadas no núcleo da célula (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; KURTESHI; LETAJ, 2013).

O Ensaio cometa permite a detecção de quebras primárias na fita de DNA em células individuais, avaliadas por meio de eletroforese em microgel (SINGH *et al.*, 1988; FERRARO *et al.*, 2004). O princípio do teste se baseia no fato de que o DNA de uma célula sem danos migrará em conjunto. Por outro lado, caso o DNA esteja com danos, serão formadas porções de diversos tamanhos, que migrarão em velocidades diferentes, formando-se uma figura semelhante a um cometa.

1.3.4 Biomarcador de neurotoxicidade

Para a análise da neurotoxicidade, as colinesterases são as enzimas mais utilizadas, especialmente, a acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Esta enzima encontra-se ao longo da superfície externa da membrana pós-sináptica dos neurônios onde hidrolisa a acetilcolina logo após ligar com o receptor nicotínico modulando a abertura dos canais de Na^+ . A diminuição do neurotransmissor acetilcolina previne a geração contínua de impulsos nervosos (MICHELSON; ZEIMAL, 2014).

Com a inibição da atividade desta enzima os canais de Na^+ permanecem abertos, promovendo a sobreposição de impulsos nervosos. Ocorre um bloqueio da transmissão do impulso nervoso, podendo ocorrer hiperatividade, asfixia e até mesmo a morte do animal (O'BRIEN, 2014). Embora os organofosforados e carbamatos sejam identificados como inibidores específicos do sítio ativo das colinesterases (TOUGU, 2001; COLOVIC *et al.*,

2013), pesquisas recentes identificam outros contaminantes, como os metais, que também inibem esta enzima (FRASCO *et al.*, 2005; DE JESUS *et al.*, 2013; YAO *et al.*, 2014).

1.3.5 Biomarcadores de estresse oxidativo

Certos biomarcadores bioquímicos permitem a avaliação do sistema antioxidante do organismo. Para os organismos aeróbicos o oxigênio tem um papel fundamental como aceptor de elétrons no processo de geração de energia na mitocôndria ou na membrana celular de muitas bactérias. Também participa em outros processos metabólicos. A grande desvantagem do oxigênio é a geração de substâncias tóxicas intra e extracelulares ao ocorrer a diminuição parcial da pressão. O oxigênio quando é consumido pela célula é reduzido à água, acoplado à oxidação de alimentos e transformação de energia como, por exemplo, durante o transporte de elétrons. Como resultado se formam espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio, e radicais livres como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil (OH^{\cdot}), ácido hipocloroso (HOCl), peroxinitrito ($ONOO^-$), e alquila (RO^{\cdot}_2) (JONES, 2006).

As EROs são altamente reativas e interagem com as macromoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) causando danos à integridade da célula (HALLIWELL, 2007; DAVIES, 2016). Os organismos possuem mecanismos de defesa antioxidante que permitem a inativação e remoção destas EROs ou os danos causados pelas EROs. Quando a produção de moléculas oxidantes ultrapassa a presença de substâncias antioxidantes ocorre um desequilíbrio chamado Estresse Oxidativo. Este desequilíbrio pode causar dano celular, mas também provoca a modulação de vias de transdução de sinalização e a expressão de genes dos mecanismos redox (JONES, 2006; HALLIWELL, 2007).

As EROs são produzidas principalmente na mitocôndria e no retículo endoplasmático dos hepatócitos *via* enzimas do citocromo P450. Por esse motivo a maior quantidade de pesquisas foca na análise dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado, pois, como já mencionado, é o órgão central

relacionado com as rotas metabólicas e de detoxificação dos xenobiontes (KAUD; EL-DAHSHAN, 2010; SILVA DE ASSIS, 2013).

Existem vários mecanismos antioxidantes que permitem a prevenção dos danos das EROs. A Glutathione (GS) é um tripeptídeo linear composto por ácido glutâmico, glicina e cisteína. Pode ser oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) com facilidade, participando em vários mecanismos para a eliminação de EROs. A GSH atua como substrato da Glutathione peroxidase para a eliminação de peróxidos, como substrato da Glutathione S-Transferase para a eliminação de xenobiontes por conjugação e na redução da forma oxidada da Vitamina C, permitindo a manutenção da Vitamina E na sua forma reduzida, e assim promovendo a ação antioxidante. A Glutathione participa na síntese de DNA e de várias proteínas. A depleção da forma reduzida (GSH) no metabolismo dos xenobiontes pode causar a diminuição da síntese de enzimas que participam na detoxificação, aumentando a possibilidades dos danos irreversíveis na célula, o que pode ativar o processo de apoptose (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A Glutathione S-Transferase (GST), representa uma importante família de isoenzimas citosólicas pertencentes à fase II de biotransformação, pois participa na conjugação de muitos xenobiontes com a GSH. Esta reação torna os produtos da reação menos tóxicos e mais hidrofílicos, facilitando a eliminação destes compostos. É associada ao estresse oxidativo pela associação com GSH como cofator, pois, como foi descrito anteriormente, a GSH participa na eliminação das EROs. Muitos dos xenobiontes aumentam a geração de EROs, e a eliminação destes promovida pela GST é um dos mecanismos de defesa contra danos oxidativos (BOELSTERLI, 2007).

Outros sistemas enzimáticos promovem a eliminação direta das EROs. Entre eles, Catalase (CAT) remove o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse. A CAT permite a degradação eficiente do peróxido de hidrogênio em água e dióxigênio e atua na detoxificação de diferentes substratos na oxidação de fenóis e álcoois acoplada à redução de peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

As membranas lipídicas são as estruturas mais susceptíveis às reações de oxidação mediadas pelas EROs (NIKI, 2014; DAVIES, 2016; CIPAK-GASPAROVIC *et al.*, 2017). A peroxidação lipídica (LPO) pode ocorrer quando existe estresse oxidativo, constituindo-se um biomarcador que detecta a ação dos radicais livres. Os hidroperóxidos formados reagem com os ácidos graxos da membrana ocasionam danos à sua estrutura química. As consequências da modificação das membranas podem ser a diminuição da fluidez e inibição da atividade de proteínas transportadoras, podendo alterar as funções de transporte e o papel de barreira seletiva (NIKI, 2014).

Outro biomarcador para a ação dos radicais livres é a concentração de proteínas carboniladas (PCO). Em proteínas, as EROs oxidam diretamente as cadeias laterais de aminoácidos (especialmente Cys, His e Lys) gerando aldeídos e cetonas e provocando maior hidrofobia e resistência à proteólise nestas proteínas (DALLE-DONNE *et al.*, 2003; WONG *et al.*, 2008).

1.3.6 Biomarcador de exposição aos metais: Metalotioneínas

Metalotioneínas (MTs) são uma família de proteínas de baixo peso molecular, em torno de 6 – 7 kDa, encontradas no citosol de células eucarióticas, especialmente no fígado, rins, intestino e cérebro. Sua estrutura molecular é composta de uma única cadeia de aminoácidos, dos quais 30% são cisteínas. Os grupos SH das cisteínas têm facilidade de se ligar com os íons metálicos dos grupos IB e IIB da tabela periódica (Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, e Zn) (AMIARD *et al.*, 2006; FRANK; SINGER; SURES, 2008; NORDBERG; NORDBERG, 2009).

A grande ubiquidade das metalotioneínas permite fornecer íons catalíticos essenciais para proteínas e reações enzimáticas e para participar da regulação homeostática. A metalotioneína pode ser bloqueada pelos íons de um metal e perder a sua atividade biológica, sendo sintetizada novamente. Ao aumentar a transcrição genética e síntese de metalotioneína, suas concentrações no sangue e órgãos aumentam e podem ser utilizadas como moléculas de exposição bioindicadora em seres humanos, animais e plantas.

Esta exposição afeta principalmente, e em geral, o fígado e rim, devido à passagem forçada, metabolismo, desintoxicação e excreção das metalotioneínas por esses órgãos (NORDBERG; NORDBERG, 2009; MOTTA, 2012).

Estudos têm demonstrado que a indução da síntese de MTs em peixes por mercúrio, cádmio e zinco fornece uma ferramenta útil para avaliar a biodisponibilidade e o impacto desses metais nos ambientes aquáticos (ATLI; CANLI, 2008; VERGANI, 2009; PEREIRA, 2014).

1.3.7 Biomarcador de metabolismo de HPAs

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos considerados pelas Agências de Proteção Ambiental como poluentes com alta prioridade para sua detecção e estudo, pois apresentarem alta toxicidade e persistência no meio ambiente (IPCS, 1998; JOHNSEN; KARLSON, 2007; ABDEL-SHAIFY; MANSOUR, 2016). São hidrocarbonetos com dois ou mais anéis aromáticos, altamente lipossolúveis. Quando são absorvidos pelo intestino são distribuídos rapidamente pelos tecidos e acumulados no tecido adiposo. Os HPAs são biotransformados via citocromo P450 em fígado fundamentalmente mediante oxidação e hidroxilação resultando em produtos que podem reagir com os componentes do DNA (STEIN; OLIVER JR; SCHWAAB, 2010). A presença destes produtos da metabolização dos HPAs na bile em peixes pode ser um bom indicador de contaminação crônica, uma vez que a metabolização destes compostos é eficiente, sendo a bile a principal rota de excreção destes compostos após conjugação com sulfato, ácido glucurônico ou glutathione (GARCÍA-MARTINEZ, 2005; STEIN; OLIVER JR; SCHWAAB, 2010).

1.4 BIOINDICADORES

Bioindicadores são espécies de organismos vivos que podem responder à poluição ambiental mediante mudanças na sua fisiologia ou através da sua capacidade para acumular poluentes. Os bioindicadores podem oferecer

informação sobre os riscos para outros organismos, assim como o risco para o ser humano (RIBEIRO *et al.*, 2005), permitindo a avaliação da saúde de um determinado ecossistema.

Alguns fatores devem ser considerados na escolha de espécies bioindicadoras em estudos de biomonitoramento: (1) a espécie deve ser representativa da área de estudo; (2) deve possuir hábito preferencialmente sedentário ou de baixa mobilidade, constituindo assim populações fixas a fim de que sua exposição aos contaminantes possa refletir as condições da região em estudo (RADTKE, 1979); (3) os organismos bioindicadores devem ser de fácil identificação e coleta em todas as estações do ano; (4) o tamanho do animal é um fator importante, pois deve possibilitar a obtenção de material biológico suficiente para garantir a realização das análises propostas no estudo (STEWART e MALLEY, 1997); e (5) o nível trófico da espécie a ser utilizada também deve ser avaliado, pois espécies que ocupam níveis tróficos superiores geralmente são mais representativas, uma vez que podem fornecer informações relacionadas aos fenômenos de bioacumulação e biomagnificação (RIBEIRO *et al.*, 1999; VIVES e GRIMALT, 2002).

Peixes apresentam várias das características acima citadas e podem ser considerados excelentes bioindicadores. Estes organismos vêm sendo amplamente utilizados em estudos de toxicologia e monitoramento ambiental, na avaliação da saúde dos ecossistemas aquáticos tanto com relação à presença quanto aos efeitos de poluentes (RIBEIRO *et al.*, 2005; BINELLI; RIVA; PROVINI, 2006; MELA *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA, 2013).

1.4.1 *Oreochromis niloticus*

Neste trabalho, a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1) foi escolhida como bioindicador, pois é uma espécie de grande distribuição geográfica, presente em toda a bacia hidrográfica de Alto Iguaçu (IAP, 2015), possui um ciclo de vida curto e apresenta uma ampla capacidade de adaptação, o que lhe permite colonizar habitats diversos. Vivem em ambiente bentopelágico, toleram as baixas temperaturas e variados graus de salinidade

e são omnívoros (zooplâncton e fitoplâncton) (GONZÁLEZ-MILLE *et al.*, 2010). Procuram corpos de água doce e pelos seus hábitos alimentares entram em contato com diversos tipos de contaminantes. Todas estas características fazem da Tilápia uma espécie adequada para o biomonitoramento.

No Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), proveniente da Costa do Marfim no Oeste africano, foi introduzida no Nordeste em 1971 e, então, distribuída pelo país. Esta espécie é cultivada desde a bacia do Rio Amazonas até o Rio Grande de Sul. O interesse pelo cultivo desta espécie, no sul e sudoeste do país, cresceu rapidamente nos últimos anos pela introdução da tecnologia da reversão sexual e também pela pesca esportiva. A Tilápia do Nilo destaca-se como peixe de potencial para aquicultura, devido a sua rusticidade, crescimento rápido e adaptação ao confinamento; possui hábito alimentar onívoro, e aceita rações com grande facilidade, desde o período de pós-larva até a fase adulta (YUE; LIN; LI, 2016).

Figura 1 - Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* L.



FONTE: O Autor (2016).

1.5 ÁREA DE ESTUDO

1.5.1 Rio Iguaçu

No estado do Paraná encontramos duas bacias hidrográficas fundamentais: A bacia do Rio Paraná, da qual o Estado recebe seu nome; e a

bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, que começa perto da capital do Estado, Curitiba, com uma extensão total de 910 km.

A bacia hidrográfica do Rio Iguaçu abrange os estados do Paraná e de Santa Catarina, além de áreas da província de Misiones, na Argentina. No Estado do Paraná, cobre uma superfície de 57.329 km². No Estado de Santa Catarina cobre uma superfície de 13.470 km².

O curso a partir das nascentes, na borda ocidental da Serra do Mar, no Planalto de Curitiba até a garganta de superimposição na Serra Geral no Planalto de Ponta Grossa, apresenta um vale raso e amplo onde o seu curso é sinuoso e até meândrico, onde são extraídas areias usadas para a construção civil.

Atualmente, o Rio Iguaçu não atende a demanda de água para abastecimento na região metropolitana de Curitiba, tanto pela vazão insuficiente, quanto pela qualidade da água (IAP, 2005, 2009; GALLOTTA; CHRISTENSEN, 2012; BACOVIS, 2015). Ao atravessar a Região Metropolitana de Curitiba, o Rio Iguaçu recebe o lixo industrial e o esgoto doméstico da metrópole de praticamente três milhões de habitantes. Ao deixar Curitiba, o Rio Iguaçu não apresenta sinais de peixes, sua cor é cinza-escuro, as águas emitem cheiro de gás sulfídrico e manchas vermelhas se acumulam nas suas margens (dejetos de ferro, mercúrio e manganês). Esta situação faz do Rio Iguaçu o segundo Rio urbano mais poluído do país, atrás apenas do Rio Tietê (IBGE, 2012; BACOVIS, 2015).

A primeira parte do Alto Iguaçu está marcada pela alta poluição do Rio e seus afluentes (principalmente os rios, Atuba, Barigüi, Belém e Irai). Todos atravessam a Região Metropolitana e recebem altas cargas do poluente de esgotos domésticos e resíduos das Indústrias, principalmente aquelas localizadas na Cidade Industrial de Curitiba (MENDONÇA, 2002; FERNANDES, 2008), responsáveis pela fabricação de produtos como papel, fertilizantes, automóveis e alimentos. Também existe a poluição residual do acidente na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR) em 2000 (PUERARI, 2011) aonde mais de quatro milhões de litros de petróleo cru vazaram de um duto do OSPAR (Oleoduto Santa Catarina – Paraná) e

contaminavam a bacia do Arroio Saldanha e os rios Barigui e Iguaçu. Segundo laudo feito por uma comissão de investigação o problema começou com uma falha humana. Nos dias posteriores à tragédia da Repar, a mancha negra chegava a cobrir todo o leito dos rios em determinados pontos. A fauna e a flora local foram devastadas. Levantamento do Instituto Ambiental do Paraná apontou que de cada oito animais retirados pelas equipes de resgate, apenas um sobrevivia (CNQ, 2015).

Estudos realizados no Rio Iguaçu e seus afluentes detectaram a presença de mercúrio (WIENS, 2001), altas concentrações de Titânio, Potássio (K), Zircônio (Zr) e Manganês (Mn), consideráveis concentrações de Alumínio (Al), Ferro (Fe) e Fósforo (P), assim como moderadas para Cobre (Cu) (FERNANDES, 2008; SILVA, 2015). SILVA (2015) indica que a contribuição total da carga de poluentes foi mais expressiva no município Araucária do estado Paraná.

A literatura cita que os poluentes mais encontrados nas águas do Rio Iguaçu e seus afluentes apresentam efeitos a curto, médio e longo prazo nos organismos vivos. Geralmente interferem no metabolismo, no sistema nervoso e no material genético (RAMSDORF, 2011; PEREIRA, 2014, YAMAMOTO *et al.*, 2016) causando não somente danos em tecidos e órgãos destes organismos, como também às futuras gerações fazendo com que os efeitos dos poluentes se mantenham durante longo tempo nos ecossistemas e nas cadeias alimentares. Por outro lado, os vários poluentes (metais, HPAs e organohalogenados) podem ser bioacumulados com facilidade nos organismos aquáticos e dificilmente são metabolizados por esses organismos, sendo biomagnificados ao longo dessas cadeias alimentares chegando então apresentar altas doses no momento em que são consumidas pelo homem (RIBEIRO *et al.*, 2005; SOUZA; DUARTE; PIMENTEL, 2013).

Poluentes, encontrados em quase toda a bacia metropolitana, são os derivados dos produtos orgânicos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, organoclorados, bifenis polibromados e esteróis, tendo como origem o aporte do esgoto doméstico e industrial (PUERARI, 2011). A presença de altas concentrações de hormônios femininos (PADILHA; LEITZKE, 2013) foi detectada em variados pontos da Bacia do Alto Iguaçu e os autores relacionam

os resultados aos despejos domésticos que chegam aos rios e córregos da Região.

As diversas pesquisas na Bacia do Alto Iguaçu ressaltam as péssimas condições da qualidade da água na bacia, com rios apresentando elevado risco de não atendimento aos limites de classe de enquadramento, tanto em afluentes como no Rio principal, limitando o desenvolvimento social e econômico da região em função da redução da disponibilidade hídrica (IBGE, 2010; COELHO, 2013; SILVA, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

O alto nível de industrialização, a necessidade do aumento de produção, aliada à alta densidade populacional (distribuídas principalmente em áreas geográficas próximas aos recursos hídricos), e a intensa atividade agrícola, têm aumentado significativamente os lançamentos de despejos e resíduos nos cursos d'água. Com isso a fragilidade dos ambientes aquáticos nos apresenta uma previsão de comprometimento dos recursos hídricos e a diminuição de fontes de água potável de forma mais otimista nas próximas décadas, caso não sejam tomadas medidas enérgicas e definitivas a tempo.

A fim de obtermos dados mais consistentes sobre a qualidade da água do Rio Iguaçu, e a avaliação dos efeitos adversos da poluição nos ecossistemas aquáticos, não poderíamos utilizar apenas uma análise química da água. Neste sentido, a ecotoxicologia e o uso de biomarcadores de contaminação ambiental acenam como ferramentas consolidadas e viáveis, ajudando a compreender os efeitos prejudiciais de alguns poluentes para a saúde dos rios e para a biodiversidade. Além disso, este estudo aborda o risco constante de populações humanas próximas ao Rio Iguaçu, que pelo consumo da água e dos peixes como a Tilapia, presentes e cultivados ao longo de diferentes reservatórios do Rio Iguaçu, podem estar expostas a micropoluentes (metais pesados, agrotóxicos, hidrocarbonetos, compostos organoclorados como PCBs, Dioxinas, Furanos e pesticidas), todos decorrentes da atividade agrícola, industrial e urbana que se desenvolvem nas margens da bacia do Rio Iguaçu, na Região Metropolitana de Curitiba.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade da água do Rio Iguaçu por meio de biomarcadores utilizando exemplares juvenis de *Oreochromis niloticus*, mantidos em condições experimentais de laboratório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

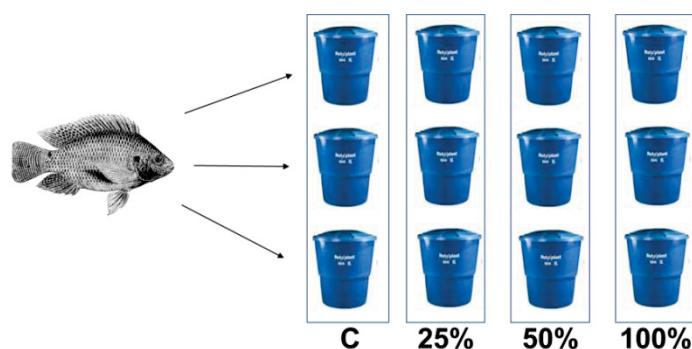
- ✓ Avaliar, por meio de análises químicas, a presença de HPAs, metais tóxicos, organoclorados (PCBs e pesticidas organoclorados - POCs) e Éteres de difenila polibromados (PBDEs) na água do Rio Iguaçu;
- ✓ Determinar a taxa de crescimento e sobrevivência de *O. niloticus* estabelecendo os índice somáticos após exposição à água do Rio Iguaçu;
- ✓ Avaliar os aspectos histopatológicos em tecidos alvo de *O. niloticus*, estabelecendo índices de lesão após exposição à água do Rio Iguaçu;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico da água do Rio Iguaçu através de ensaio cometa e contagem de micronúcleos em eritrócitos de *O. niloticus*;
- ✓ Utilizar biomarcadores bioquímicos para avaliar a atividade da enzima colinesterase, respostas antioxidantes e a concentração de metalotioneína em tecidos alvos de *O. niloticus* após exposição à água do Rio Iguaçu;
- ✓ Avaliar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bile de *O. niloticus* após exposição à água do Rio Iguaçu.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Os exemplares (juvenis) de *O. niloticus* ($0,645 \pm 0,015$ g peso; $4,357 \pm 0,457$ cm comprimento) foram obtidos na estação de piscicultura Panamá ($27^{\circ}57'34.97''$ S; $48^{\circ}45'27.95''$ O), localizada no município de Paulo Lopes, ao sul de Florianópolis (SC), cujas atividades são estocagem de reprodutores, produção de alevinos e pesquisa. Foram montados 12 tanques de 100 litros cada, onde foram distribuídos randomicamente 17 indivíduos por tanque em triplicatas, cada triplicata corresponde a um grupo teste e um grupo controle (Figura 2). A água foi testada sem diluição e sob duas diferentes diluições (25 e 50%), além do grupo controle que recebeu água filtrada através de filtros de resina e carvão ativado de outra fonte. A cada oito dias, 50% da água foi renovada, com água proveniente do mesmo ponto de coleta no Rio Iguaçu. A exposição ocorreu por um período de 72 dias, correspondendo, portanto, a oito renovações da água. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (8 e 16 h) com ração comercial *Poytara*, “Carpa Crescimento” suplementada com carnitina, enzimas digestivas e probióticos. Todos os tanques foram mantidos sob oxigenação constante, além de controle da temperatura em $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, segundo o nível ótimo descrito para *O. niloticus*. Alguns parâmetros físico-químicos de qualidade da água nos tanques foram monitorados diariamente, como temperatura, oxigênio dissolvido, nitritos, amônia, pH e condutividade. O bioensaio se desenvolveu durante a estação chuvosa de verão - outono, desde 21 de janeiro até 30 de março.

Figura 2 - Desenho experimental realizado na Universidade Federal do Paraná. Laboratório de Bioensaios.



FONTE: O Autor (2016).

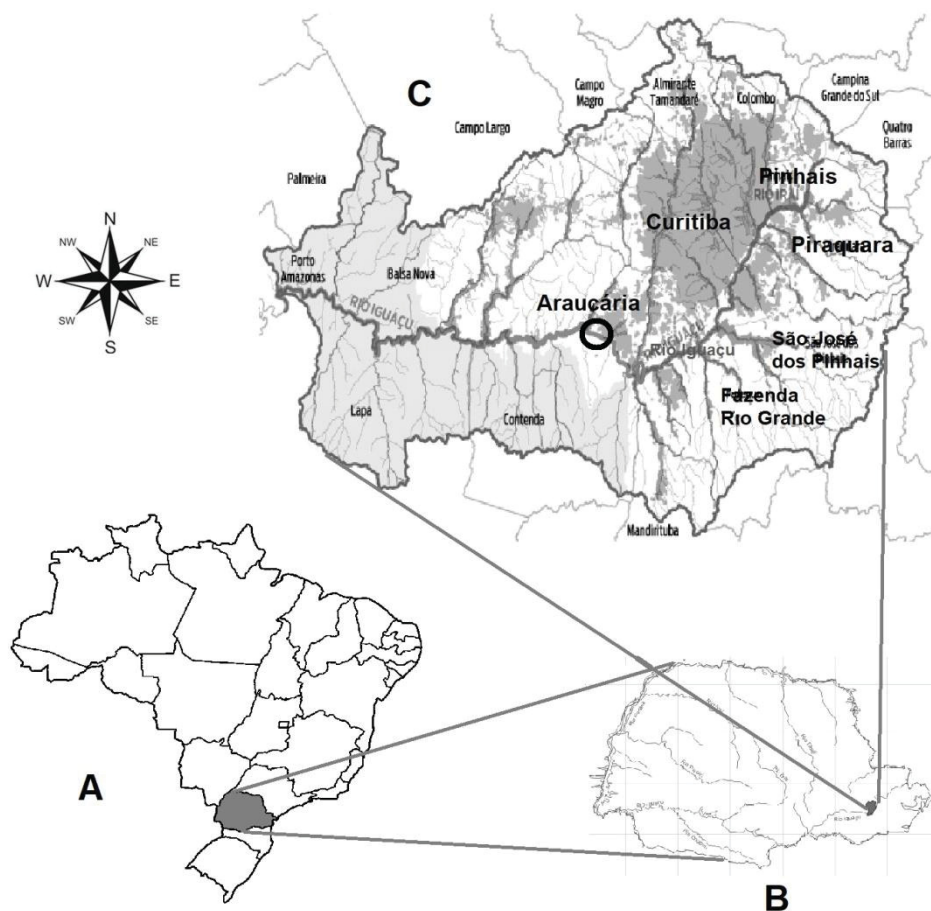
4.2 COMITÊ DE ÉTICA

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO - UFPR) certificou (Certificado 1060) que os procedimentos utilizados nos peixes no projeto de pesquisa estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

4.3 COLETA DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU

A coleta da água foi realizada em um ponto específico do Rio Iguaçu (25°35'54.56" S; 49°24'48.45" O), logo após a passagem do Rio pela Cidade Industrial de Curitiba, no município de Araucária (Figura 3). Este é o ponto do Rio onde já houve a passagem por todas as regiões de maior atividade antrópica da região metropolitana de Curitiba, sendo considerada a área mais poluída do Rio. A água coletada foi transportada em containeres de 200 litros até o Laboratório de Toxicologia Celular, onde ficou por um período de 24 horas sob aeração, antes de ser utilizada nos experimentos.

Figura 3 - Mapas mostrando o Brasil (A), Estado do Paraná (B) e Bacia do Alto Iguaçu na região metropolitana de Curitiba.



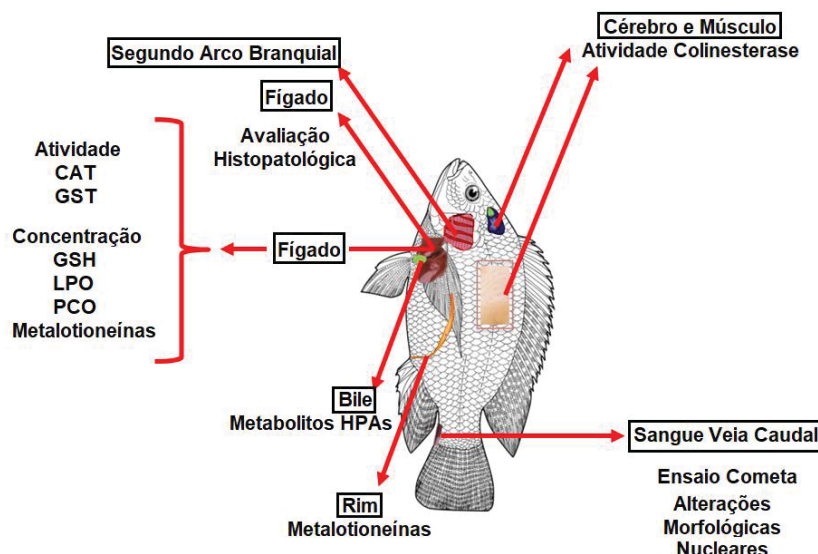
FONTE: Modificado de IAP (2002).

NOTA: O círculo na figura C mostra o lugar de coleta de mostras da água após a passagem do Rio pela região metropolitana de Curitiba no município de Araucária.

4.4 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após a exposição, os peixes do grupo de controle e expostos à água do Rio Iguaçu foram anestesiados com 0,02% de MS222 (etil-éster-3 aminobenzoico, Sigma) durante 2-3 min. O sangue (n = 40, 10 para cada grupo) foi amostrado através da punção da veia caudal, e em seguida os peixes foram rapidamente eutanasiados mediante incisão da medula espinhal. Foi diluído no soro fetal bovino (SFB) para ensaio cometa e teste de micronúcleo pístico. As amostras de fígado, cérebro, rim, músculo e bile (n = 182) foram obtidas e mantidas a -80°C até serem analisadas ou imediatamente fixadas (fígado (n = 18 para cada grupo) e brânquias (n = 15 para cada grupo)) para análise histopatológica.

Figura 4 – Coleta de amostras de tecidos dos peixes *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu e os biomarcadores utilizados para o estudo dos efeitos da exposição.



FONTE: O Autor (2017).

LEGENDA: CAT – Catalase, GST – Glutathione – S – Transferase, GSH – Glutathione Reduzida, LPO – Lipoperoxidação, PCO – Proteínas Carboniladas, HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.

4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU

Amostras da água foram coletadas em garrafas de polietileno esterilizadas de 1L para a análise de metais, HPAs, PCBs, OCs e PBDEs. Os metais foram analisados pelo Grupo de Pesquisa sobre Química Analítica Ambiental e Sanitária (QAAS), na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Paraná, primeiro as amostras foram digeridas segundo a metodologia EPA 3005-a (USEPA, 1992). A amostra de água (100 mL) foi aquecida com $\text{HNO}_3_{\text{conc}}$ (2 mL) e HCl_{conc} (5 mL) numa fonte de aquecimento de placa quente a 90 a 95 ° C até o volume ser reduzido para 20 mL. A amostra foi então filtrada e diluída até um volume final de 100 mL com água desionizada destilada e foi então preparada para análise de Espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado. Foram determinados os teores dos seguintes íons metálicos: níquel (Ni), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), chumbo (Pb), cobre (Cu), manganês (Mn), ferro (Fe) e zinco (Zn).

Os compostos orgânicos, foram analisados no Laboratório de Geoquímica Orgânica e Poluição Marinha (LaGPoM), no Centro de Estudos do Mar, da UFPR segundo a metodologia EPA 3510C (USEPA, 1996). O procedimento analítico utilizado para Poluentes Orgânicos persistentes (POPs) incluiu a extração Soxhlet de compostos orgânicos das amostras da água em 80 mL de uma mistura de diclorometano (DCM) e n-hexano (1: 1, v: v) ao longo de 8 h. Uma mistura de substitutos de PCB₁₀₃ e PCB₁₉₈ foi adicionada antes da extração. Para a extração dos compostos orgânicos em água, foi utilizada a metodologia de CARDOSO; DAUNER e MARTINS, (2016) para determinação cromatográfica dos HPAs e para determinação cromatográfica dos compostos organohalogenados segundo SOUZA *et al.*, (2018, no prelo).

4.6 BIOMARCADORES SOMÁTICOS

Tanto ao início como no final do experimento foram registrados os dados de peso (g) e comprimento (cm) de todos os exemplares juvenis de *O. niloticus* para cálculo dos seguintes índices de crescimento (TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2000; DOS SANTOS *et al.*, 2007; CAMARA; CARAMASCHI; PETRY, 2011):

- Ganho de peso (GP): $Gp = Pf - Pi$;

onde, Pf = Peso final (g); Pi = Peso inicial (g).

- Taxa de crescimento específico (TCE): $TCE = 100 * [(\ln Pf - \ln Pi)/t]$,

onde, Pf = Peso final (g); Pi = Peso inicial (g); ln: Logaritmo natural; t = tempo em dias.

- Fator de condição (K): $FC = Pf/Cf^3 \times 100$;

onde, Pf = peso final (g) e Cf^3 = cubo do comprimento final (cm).

- Taxa de sobrevivência (TS): $TS = 100 \times (\text{número final de peixes}/\text{número inicial de peixes})$.

- Índice Hepatosomático (IHS): $IHS = (PF_{\text{ígado}}/Pf) \times 100$;

onde, PFígado = peso fígado (g) e Pf = peso final de peixe (g).

4.7 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Foram coletadas amostras do fígado (n=18 para cada grupo) para análise histopatológica em microscópio de luz e dados de peso do fígado para cálculo de índice hepatossomático (IHS). Além disso, foi coletado o segundo arco branquial direito (n= 15 para cada grupo) para análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o fígado as mostras foram fixadas em ALFAC (etanol 85%, formol 10% e ácido acético 5%) por 16 horas, incluídas e coradas com Hematoxilina/Eosina.

Para análise das alterações foi utilizado o método de BERNET *et al.*, (1999) onde foram estabelecidos o índice de lesão. Estas foram consideradas de acordo com os seus respectivos fatores de importância (Tabela 1), onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância moderada, a lesão é reversível em muitos casos e (3) importância marcante, a lesão é geralmente irreversível, levando a diminuição das funções do órgão. De acordo com os graus de ocorrência, com valores atribuídos para as alterações observadas em cada tratamento, sendo: (0) Inalterado, (1) Ocorrência Ocasional, (2) Ocorrência Leve, (3) Ocorrência entre Leve e Moderada, (4) Ocorrência Moderada, (5) Ocorrência entre moderada e severa e (6) Ocorrência severa (lesão difusa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum pr \sum alt (a \times w)$$

Onde : pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w =fator de importância.

Tabela 1 - Alterações histopatológicas analisadas no fígado dos peixes *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu, com seus respectivos fatores de importância.

Alteração histopatológica	Fator de importância.
Necrose	3
Infiltração leucocitária	2
Hemorragia, dilatação de sinusoides	1
Esteatose	1

FONTE: Modificada de BERNET *et al.*, (1999).

Para brânquias, 15 amostras por grupo foram fixadas em glutaraldeído (3%) por 2h, processadas até a completa desidratação no ponto crítico e metalizados com ouro para a análise no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM – 6360 LV *Scanning Electron Microscope* (300 mil X).

4.8 ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE

4.8.1 Ensaio cometa

O sangue utilizado para o ensaio cometa foi processado segundo o método de SINGH *et al.*, (1988) e modificado por FERRARO *et al.*, (2004). Para tanto, 10 µL de sangue foram diluídos em 1 mL de soro bovino fetal. 10 µL da solução com soro bovino fetal foram misturados a 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e esta mistura foi colocada em uma lâmina coberta por agarose. As lâminas foram mantidas por 24 horas a 4° C em uma solução de lise (NaCl (2,5 M), EDTA (100 mM), Tris (10 mM), NaOH (0,8%), N-lauril-sarcosinato (1%), triton X100 (1%) e DMSO (10%)), protegidas da luz. Em seguida foi efetuada a desnaturação do DNA por imersão das lâminas em uma solução de NaOH/EDTA (10 N/ 200 mM, pH 13) por 25 minutos e as lâminas foram então submetidas a uma eletroforese (300 mA, 25 V) por 25 minutos. Após, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5) e fixadas em etanol

por 5 minutos. Por fim elas foram coradas com brometo de etídio ($0,02 \text{ g.mL}^{-1}$) e os nucleóides foram analisados em microscópio de epifluorescência.

Em cada amostra, 100 nucleóides ($n = 40$, 10 para cada grupo) foram visualizados e a migração do DNA foi classificada em cinco classes (0: sem dano visível; 1: dano pequeno; 2: dano médio; 3: dano extensivo e 4: dano máximo) de acordo com COLLINS *et al.* (1997). O escore foi calculado através do somatório da multiplicação do número de nucleóides encontrados em uma classe de dano pelo número da classe. A análise foi cega.

4.8.2 Teste de micronúcleos e alterações nucleares

A fim de verificar a frequência de micronúcleos, foi empregada a técnica descrita por HEDDLE (1973) e SCHMID (1975).

Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de microscopia e imediatamente foi realizado o esfregaço, sendo posteriormente fixado em etanol por 30 minutos e corado com laranja de acridina. Foram analisados 2000 eritrócitos por peixe num aumento de 1000x em um microscópio de epifluorescência. Além dos micronúcleos, foram também contabilizadas as alterações morfológicas nucleares de acordo com CARRASCO; TILBURY e MYERS, (1990).

4.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.9.1 Quantificação protéica

As concentrações de proteínas totais das alíquotas do fígado, músculo, rim e cérebro foram determinadas para normalizar os dados obtidos nos diferentes ensaios bioquímicos (BRADFORD, 1976).

Na microplaca, foram adicionados 10 µL do sobrenadante (diluído 10x) de cada amostra, seguidos de 250 µL do reativo de Bradford® (*Coomassie brilliant blue*). Para o branco, foi adicionado Soro Fetal Bovino (SFB). Foram realizadas três réplicas para cada amostra e a leitura foi feita em espectrofotômetro a comprimento de onda de 595 nm.

4.9.2 Análise de neurotoxicidade - Acetilcolinesterase (AChE)

Amostras de cérebro (n = 182) e músculo (n = 182) foram homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,5. Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 4°C, a 12000 g. Após, alíquotas dos sobrenadantes foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento da análise.

Após quantificação de proteínas estas foram normalizadas (1,0 mg/ml de proteína cada), adicionadas (20 µl) em microplaca em três réplicas, seguido de 130 µl de 5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato (DTNB) preparado a 0,75 mM e 50µl de iodeto de acetiltiocolina (ATC) 12 mM em água destilada.

O método consiste em detectar, em $\lambda = 405$ nm, o 2-nitrobenzoato-5-mercaptopitiocolina e o 5-tio-2-nitrobenzoato formados pela reação entre a tiocolina (produto da hidrólise da acetiltiocolina pela AChE) e o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca, seguindo método de ELLMAN *et al.*, (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998). A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg proteína.

4.9.3 Análises de biomarcadores de estresse oxidativo

Amostras do fígado foram homogeneizadas em SFB, pH 7,2. Os homogeneizados foram centrifugados por 20 min a 4°C, a 12000 x g. Após, alíquotas dos sobrenadantes foram armazenadas em freezer -80 °C até o momento da análise.

4.9.3.1 Atividade da Catalase

Para medir a atividade da Catalase (CAT) hepática foi utilizado o método de AEBI (1984), que se baseia no consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno pela CAT, gerando água e oxigênio, podendo ser mensurado por espectrofotometria a 240 nm. As amostras ($n = 182$) foram normalizadas para 0,3 mg/ml de proteína, e como substrato foi utilizada uma solução de H_2O_2 a 15 mM. Em microplaca foram adicionados 50 μL da amostra e 200 μL de meio de reação composto por Tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 e solução de H_2O_2 . A leitura da absorbância foi realizada a cada 15 segundos durante 1 minuto e a atividade foi expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.9.3.2 Atividade da Glutathione S-Transferase (GST)

A metodologia foi baseada na técnica descrita por KEEN; HABIG e JAKOBY, (1976) com algumas modificações. Após determinação da concentração de proteínas do sobrenadante das amostras de fígado, as amostras ($n = 182$) foram normalizadas para 1,0 mg/ml e pipetadas em triplicata (20 μL) em microplacas de 96 poços (no branco foi pipetado 20 μL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5).

Foram pipetados 180 μL do meio de reação contendo GSH 1,5 mM e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) 2 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5. A leitura em espectrofotômetro (Sunrise-TECAN) foi realizada imediatamente em seguida a $\lambda = 340$ nm com 8 leituras e intervalos de 52 segundos cada, perfazendo um tempo total de 364 segundos. Nesta metodologia, a GST catalisa a reação do substrato CDNB com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento de absorbância a 340 nm. O aumento gradual na absorbância foi monitorado no espectrofotômetro Sunrise-TECAN, a 340nm e a atividade foi expressa em μmoles de tioéter formado $\times \text{min}^{-1} \times \text{mg}$ de proteína⁻¹.

4.9.3.3 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Foram adicionados 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% em 200 µL de amostra (n = 182), ainda congelada, para precipitação protéica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50 µL do sobrenadante da amostra e 230 µL de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como “branco”, foi utilizado 230 µL do tampão Tris-base a 400 mM mais 50 µL de TCA a 8% em SFB. Por último, 20 µL de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram acrescentados e as medidas de absorbância lidas a 415 nm em espectrofotômetro. A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µM GSH); os resultados foram expressos em nanomoles de tióis/mg de proteínas.

O método baseia-se em SEDLAK e LINDSAY (1968) em que ocorre a precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o DTNB gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

4.9.3.4 Peroxidação lipídica

Os danos causados nos lipídios foram avaliados de acordo com o Método FOX (*Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method*) (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{2+} , mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{3+} - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a um comprimento de onda de 550-570 nm.

Em um microtubo de 2 mL foram pipetados 200 µL da amostra centrifugada concentrada (n = 182), acrescida de 800 µL do meio de reação. Este foi preparado na hora, utilizando metanol 100%, laranja de xilenol 100 µM, H_2SO_4 25 mM, hidroxitolueno butilado 4 mM e $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$ 25 µM. Após 20 minutos de reação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a

9.000 g. Para a leitura, 200 μ L do sobrenadante foram pipetados em microplacas e a absorbância foi medida a 550-570 nm em um espectrofotômetro de microplaca. Os resultados foram expressos em concentração de hidroperóxidos (nmol)/mg proteína.

4.9.3.5 Carbonilação de Proteínas (PCO)

Os danos estruturais em proteínas (especificamente a formação de grupos aldeídicos e cetônicos) foram avaliados segundo o método de LEVINE *et al.*, (1994) e QUINLAN e GUTTERIDGE (2000). O método consiste em reagir o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas que podem ser detectadas a 358-370 nm, entretanto, o método não detecta carbonilas com grupos funcionais como ácidos carboxílicos, amidas e ésteres que não reagem como o DNPH. Foram utilizadas alíquotas de 200 μ L de sobrenadante de homogeneizado de fígado (n = 182) (após de ser centrifugado) normalizadas para 2.0 mg de proteína/ml, onde foram adicionados 500 μ L de meio de reação contendo DNPH a 10 mM, preparado em HCl a 2 M (e 500 μ L de HCl nos tubos brancos, sem adição de DNPH) e, após 90 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados mais 700 μ L de ácido tricloroacético 28% para precipitação protéica. Em seguida foi realizada centrifugação e lavagem por ressuspensão em etanol/acetato de etila 1:1 v:v. As proteínas foram então solubilizadas em hidrocloreto de guanidina a 6 M e centrifugadas. O conteúdo de carbonilas foi determinado em espectrofotômetro Sunrise-TECAN (λ = 360 nm) em microplacas utilizando o coeficiente de absorção molar de $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para hidrazonas. Os resultados foram expressos em μmol carbonilas por mg^{-1} de proteína.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS

Para a avaliação do conteúdo de metalotioneínas (MTs) em fígado e rim foi utilizado o método proposto por VIARENGO *et al.* (1997) com algumas

modificações. Este método determina o conteúdo de sulfidrilas (presentes nas MTs) a partir da comparação com uma curva de GSH, através da determinação da absorbância a 412 nm considerando 30% como a porcentagem de cisteínas que correspondem à MTs.

Primeramente 0,1 g de amostras de fígado (n = 182) e rim (n = 182) foi homogenizado em 0,5 mL de Tampão Tris-HCL 20 mM, Sacarose 0,5 M, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,5 mM e beta-mercaptoetanol 0,01%. O homogeneizado foi centrifugado a 15000 x g durante 30 minutos a 4 ° C, para separar o sobrenadante (fracção citosólica). A cada 300 µL de sobrenadante adicionou-se 342 µL de uma solução de etanol e clorofórmio frio (-20°C) ($V_{\text{etanol}}/V_{\text{clorofórmio}} = 93/7$), para eliminar os tióis solúveis de baixo peso molecular que, quando reagidos com DTNB, poderiam interferir com a quantificação de MTs, garantindo a purificação parcial e a concentração de MTs. Em seguida, centrifugou-se a 6.000 x g durante 10 minutos, a 4 ° C. 490 µl do sobrenadante foi combinado com 1502 µl de solução de HCl a 37% e etanol absoluto frio ($V_{\text{HCl}}/V_{\text{etanol}} = 3913/87$), a acidificação desestabiliza as MTs e aumenta sua precipitação. A solução extraída foi mantida a -20 ° C durante uma hora e centrifugada novamente a 6.000 x g durante 10 minutos. O precipitado contendo a fração MT foi lavado com 87% de etanol, 1% de clorofórmio e tampão de homogeneização, depois se centrifugou a 6 000 x g durante 10 minutos. O precipitado foi seco e depois ressuspensas em 50 µL de NaCl 0,25 M e 50 µL de HCl 1 N contendo EDTA 4 mM. Em seguida, foi adicionada 1,0 ml de solução de Ellman, preparada com tampão fosfato de Na 0,2 M a pH 8, contendo ácido ditionitrobenzóico 0,43 M (DTNB), à temperatura ambiente. Finalmente, a mistura foi centrifugada durante 5 minutos a 3.000 x g. O sobrenadante foi utilizado para determinar a absorvância a 412 nm (ELLMAN, 1961). Para o branco substitui-se as amostras por 50 µL de solução de NaCl (250 mM) + 50 µl de solução de EDTA-sódico (EDTA a 4 mM + HCl a 1 M). A concentração dos grupos -SH (sulfidrilas) foi estimada utilizando a curva padrão reduzida de glutathione (GSH) com concentrações de 0, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL.

4.11 ANÁLISES DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM BILE

A bile foi extraída por meio de punção da vesícula biliar e armazenada em recipientes de vidro âmbar a -20°C até o momento da análise. Após a determinação da curva-padrão da bile e do padrão de HPAs para estabelecer a diluição das amostras, alíquotas de 10 μL de cada amostra ($n = 60$) foram diluídas na proporção 1:1000 em etanol 48% e lidas no espectrofluorímetro (TECAN Infinite M200) nos comprimentos de onda 288/330 nm, 334/376 nm, 364/406 nm e 380/422 nm (excitação/emissão) que correspondem respectivamente aos hidrocarbonetos de dois, quatro, cinco e seis anéis. O procedimento foi segundo AAS, BEYER e GOKSOYR, (2000). Os dados foram expressos em concentração de HPAs (ng/ml).

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados das análises dos biomarcadores foram expressos como média \pm erro padrão da média. A normalidade dos dados foi testada com os testes de Kolmogorov–Smirnov, Shapiro-Wilk ou D’Agostino e Pearson. Quando comprovada a distribuição normal dos dados, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de “Tukey Multiple Comparison”. Para os dados que não passaram no teste de normalidade foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A regra de decisão (α) foi de 0,05 em todas as análises e o software utilizado nas análises estatísticas foi Graph Prism v5.01.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA ÁGUA DO RIO IGUAÇU

Os valores observados para os metais cobre e manganês, estão no limite estabelecido pelo CONAMA (357/2005). Os demais metais mostram concentrações abaixo das concentrações máximas recomendadas pelo CONAMA.

Também foi verificada a presença de Cd, Cr, Co e Pb, porém estas estão abaixo dos limites de detecção.

Tanto os Organoclorados e HPAs encontrados (Tabela 2) apresentaram concentrações baixas, menores que as concentrações máximas recomendadas. Os demais Poluentes Orgânicos Persistentes não foram detectados ou se encontraram abaixo dos limites de detecção do equipamento utilizado.

Tabela 2 - Concentrações de poluentes selecionados nas amostras de água do Rio Iguaçu durante o período experimental (Metais, Organoclorados (OC) e Hidrogenocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)).

	Parâmetros	Valores ($\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb))	VMP ($\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb))
Metais	Cobre (Cu)	9,01±0,48	9,0
	Manganês (Mn)	99,0±4,41	100,0
	Ferro (Fe)	97,1±4,06	300,0
	Níquel (Ni)	9,3±1,04	25,0
	Zinco (Zn)	39,1±3,02	180,0
OC	Lindano (g-HCH)	0,003	0,020
	Dieldrin	0,001	0,005
	Endossulfan I	0,001	0,056
HPAs	Naftaleno	0,05	-
	C ₁ -naftaleno	0,02	-
	C ₂ -naftaleno	0,01	-
	C ₃ -naftaleno	0,01	-

FONTE: O Autor (2017).

LEGENDA: São apresentados os valores máximos permitidos (VMP) para a presença de metais em águas doces Res. 357/2005 do CONAMA. Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

5.2 BIOMARCADORES SOMÁTICOS

Os índices de crescimento calculados foram ordenados na tabela 3, onde não foi observada nenhuma diferença significativa no Ganho de Peso, Taxa de Crescimento Específico, Fator de Condição, Taxa de Sobrevivência e Índice Hepatossomático entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle.

Tabela 3 - Valores dos índices de crescimento de *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu.

	GP	TCE	FC	TS	IHS
G. Controle	4,877 \pm 0,270	2,890 \pm 0,080	1,863 \pm 0,0363	95,82 \pm 2,104	4.393 \pm 0.2467
G. 25%	4,456 \pm 0,241	2,803 \pm 0,066	1,838 \pm 0,0236	92,03 \pm 1,902	3.789 \pm 0.1784
G. 50%	5,032 \pm 0,412	2,902 \pm 0,085	1,993 \pm 0,0292	87,62 \pm 3,715	3.924 \pm 0.2527
G. 100%	4,877 \pm 0,345	2,866 \pm 0,086	2,178 \pm 0,2833	91,90 \pm 1,844	4.280 \pm 0.1930

FONTE: O Autor (2016).

LEGENDA: Ganho de Peso (GP), Taxa de Crescimento Específico (TCE), Fator de Condição (FC), Taxa de Sobrevivência (TS). Índice Hepatossomático, (IHS). Valores expressos em média \pm erro padrão da média.

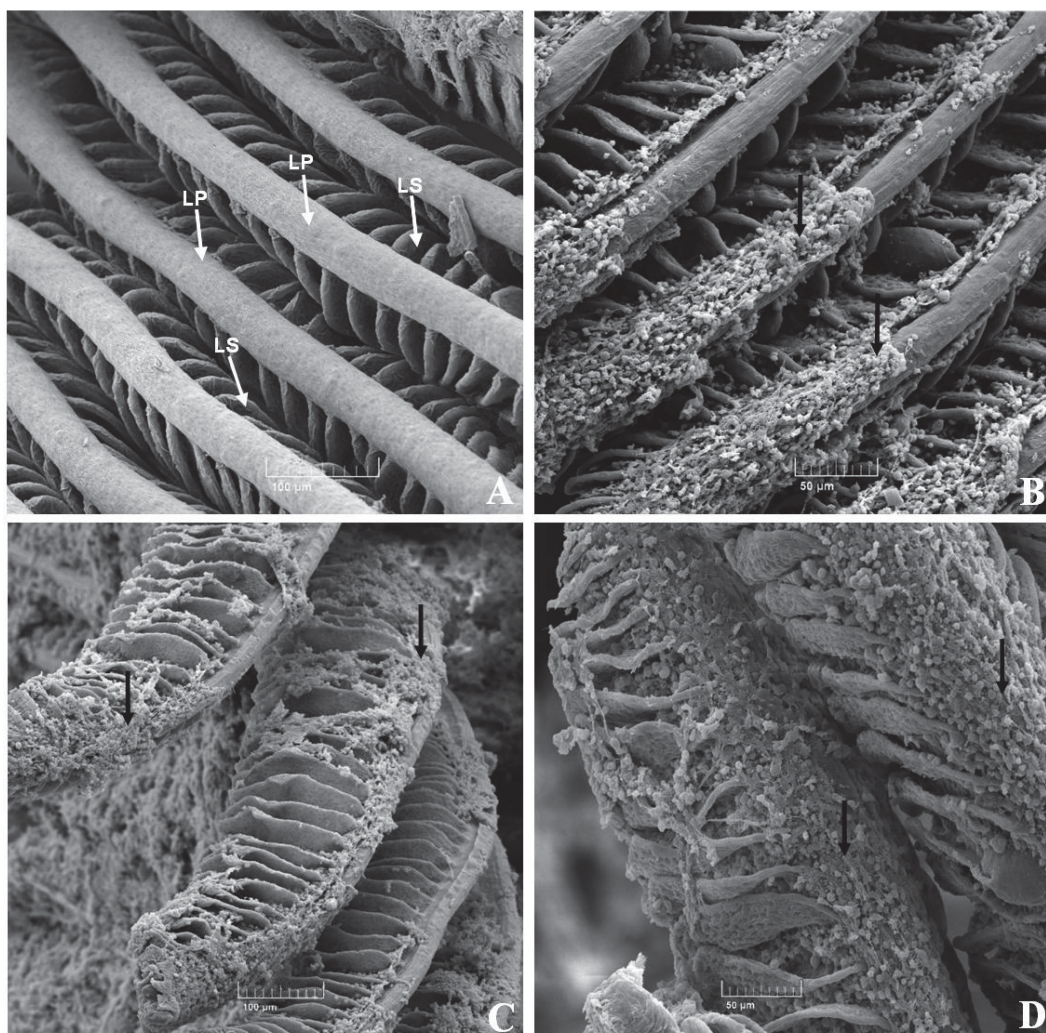
5.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura das brânquias

A secção das brânquias analisada (segundo arco branquial) apresenta duas fileiras de lamelas primárias, que por sua vez sustentam as lamelas secundárias onde ocorre a respiração. O epitélio branquial na lamela primária é constituído por células pavimentosas, células secretoras de muco e células de cloreto, estas geralmente localizadas na base da lamela secundária. A lamela secundária possui o epitélio formado por uma camada única de células

pavimentosas, apoiada na membrana basal que revestem as células pilares, cujos prolongamentos delimitam o espaço por onde circula o sangue (Figura 5A). No tecido branquial dos grupos expostos à água do Rio Iguaçu foram observadas alterações morfológicas como, a hiper-secreção de muco (Figura 5B, 5C, 5D) e diminuição das microdigitações das células pavimentosas do epitélio de revestimento (Figura 6B, 6C, 6D).

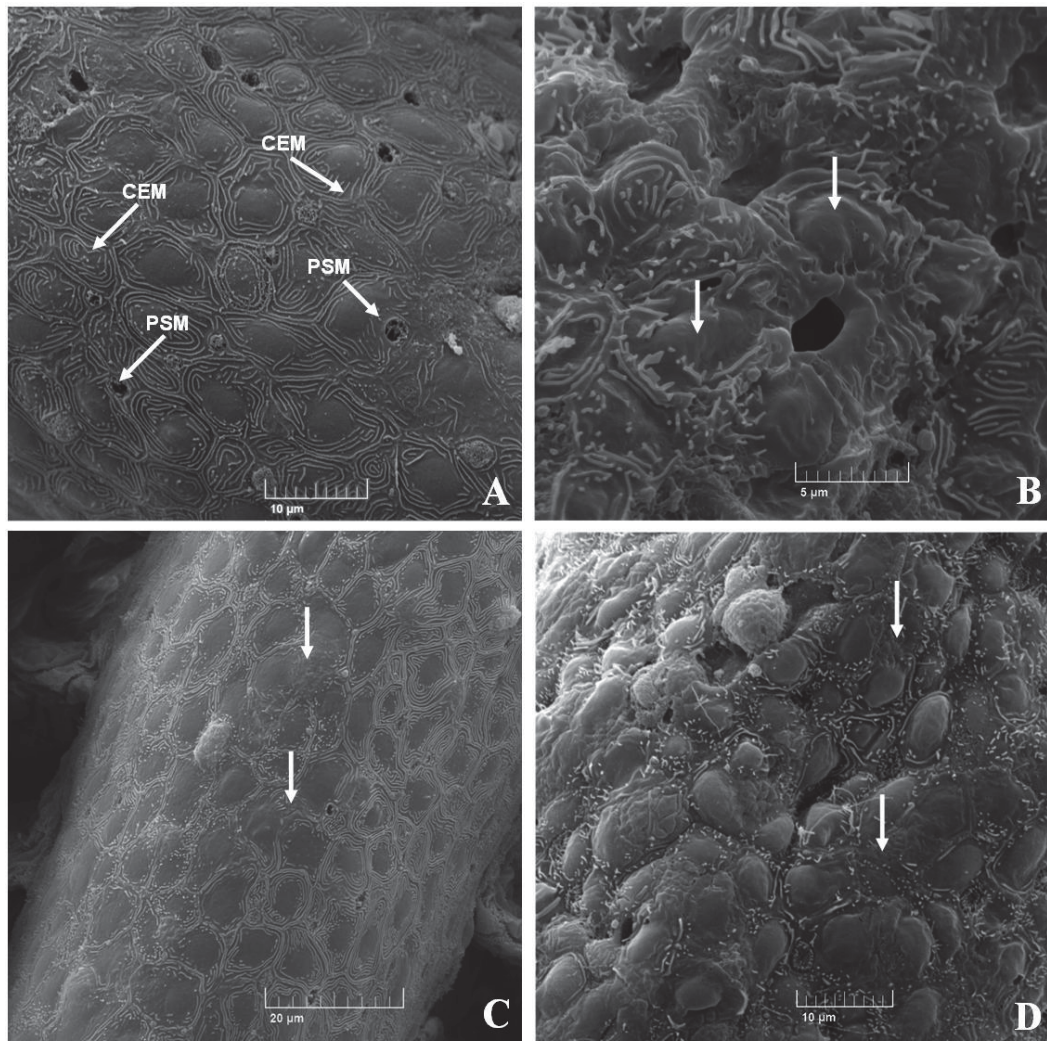
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura de brânquias de *Oreochromis niloticus*.



FONTE: O Autor (2016).

LEGENDA: A. Indivíduo Controle mostrando estrutura das lamelas primárias (LP) e lamelas secundárias (LS). B. Indivíduo exposto à água com diluição de 25%. A seta indica hiper secreção de muco. C. Indivíduo exposto à uma diluição de 50%. A seta indica hiper secreção de muco. D. Indivíduo exposto à água poluída sem diluição (100%). A seta indica hiper secreção de muco.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura da região do epitélio em brânquias de *Oreochromis niloticus*.



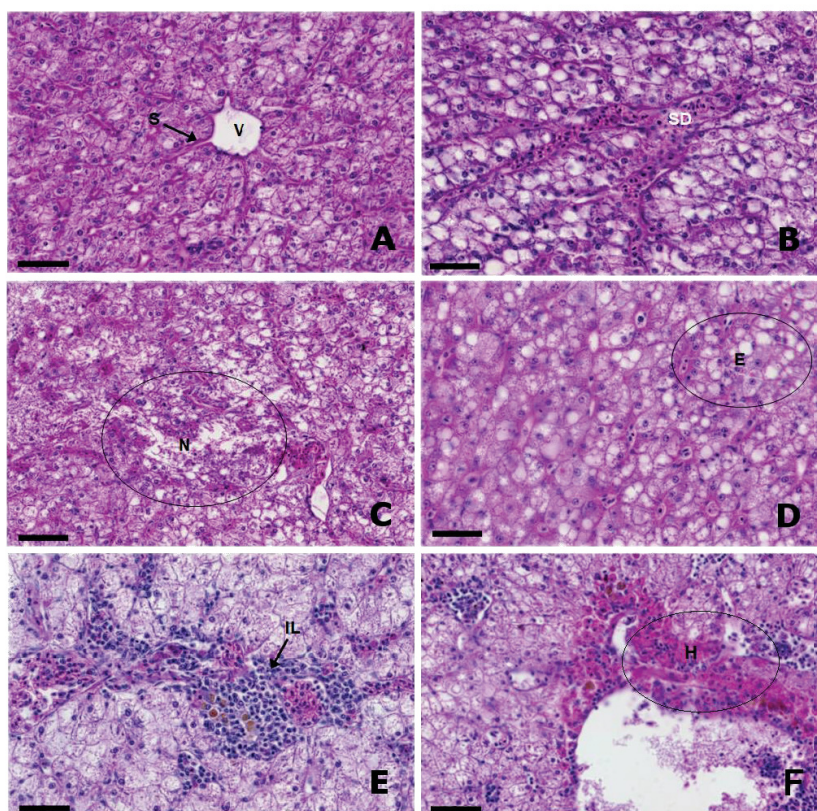
FONTE: O Autor (2016).

LEGENDA: A. Indivíduo controle, mostrando células epiteliais com microdigações (CEM) e poros secretores de muco (PSM). B. indivíduo exposto à água com diluição de 25%. As setas indicam uma diminuição de microdigações nas células epiteliais. C. indivíduo exposto à água com diluição de 50%. As setas indicam uma diminuição de microdigações nas células epiteliais. D. Indivíduo exposto à água poluída sem diluição - 100%. As setas indicam uma diminuição de microdigações nas células epiteliais.

5.3.2 Avaliação histopatológica do fígado

Os indivíduos do grupo controle apresentaram o parênquima hepático constituído por hepatócitos com forma poligonal, núcleo grande, único e normalmente central com um nucléolo evidente e único e eucromatina abundante, o que confirma a alta atividade metabólica da célula. Vasos sinusóides e vasos sanguíneos são aleatoriamente distribuídos pelo tecido e o tecido pancreático encontra-se difuso no parênquima hepático, geralmente localizado próximo a vasos sanguíneos (Figura 7A)

Figura 7 - Cortes histológicos de fígado de *Oreochromis niloticus* corados em Hematoxilina e Eosina.



FONTE: O Autor (2017).

LEGENDA: A) Indivíduo Controle. Veia central [V] e sinusoides [S]. B) Indivíduo exposto à água com diluição de 25%. Tecido hepático com sinusoides dilatados [SD]. C) e D) Indivíduo exposto à água com diluição de 50%. Tecido hepático com áreas de necrose [N]. Hepatócitos mostrando esteatose [E]. E) e F) Indivíduo exposto à

água poluída sem diluição -100%. Infiltração leucocitária [IL]. Hemorragia [H].
Escalas - 40 µm.

Entretanto, no parênquima hepático dos grupos expostos à água do Rio Iguaçu, diversas alterações foram observadas. Todos os grupos apresentaram alterações como dilatação de sinusoides, hemorragia, esteatose, infiltração leucocitária e necrose (Figura 7B-F), diferindo na intensidade e tipo de alteração em cada indivíduo (Figura 8).

Tabela 4 - Frequências relativas e médias de grau de extensão das alterações morfológicas avaliadas no fígado de *Oreochromis niloticus* em indivíduos expostos à várias diluições da água do Rio Iguaçu.

Alterações histopatológicas em fígado					
	Dilatação dos sinusóides	Hemorragia	Necrose	Esteatose	Infiltração leucocitária
Frequências relativas (%) / Média de Grau de extensão de alterações					
G. Controle	44.44 / 1.13	44.44 / 1.25	94.44 / 1.82	33.33 / 3.17	61.11 / 1.27
G. 25%	55.56 / 1.9	55.56 / 1.3	94.44 / 1.82	55.56 / 3.10	83.33 / 1.80
G. 50%	94.44 / 1.94	50.00 / 1.00	100.00 / 1.78	83.33 / 2.13	88.89 / 1.69
G. 100%	88.89 / 2.06	77.78 / 1.50	94.44 / 2.35	50.00 / 2.56	94.44 / 2.35

FONTE: O Autor (2017).

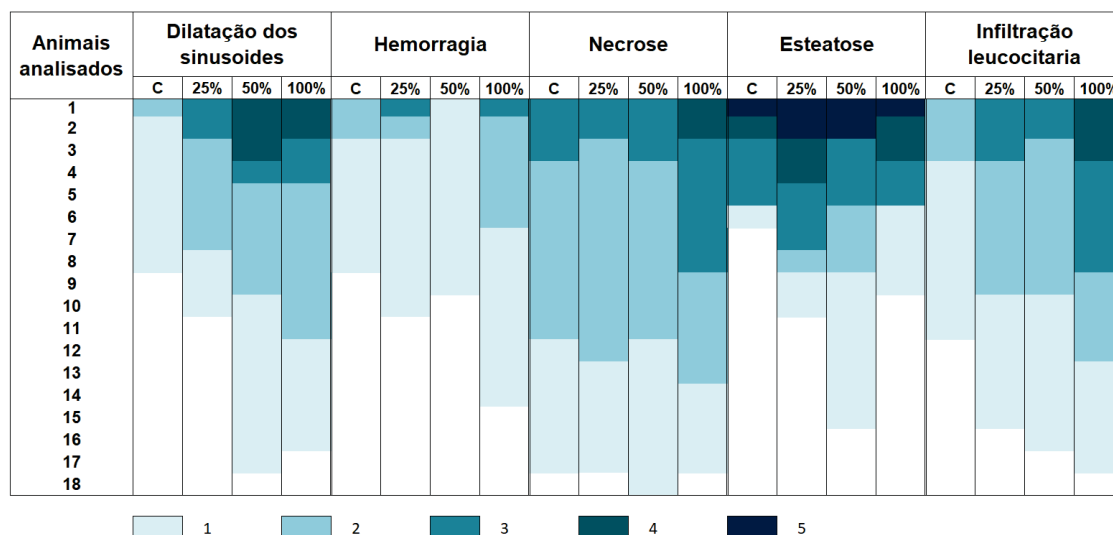
NOTA: A frequência foi calculada dividindo-se o número de indivíduos em que a lesão avaliada foi observada pelo número total de indivíduos do grupo representado.

A necrose é a lesão mais frequente em todos os grupos, encontrando-se entre 94.4 e 100% dos indivíduos, enquanto que a Esteatose é a lesão de maior média de grau de extensão presente em todos os grupos (Tabela 4) com todos estes apresentando grau entre moderado e severo (Figura 8). Todas as lesões, exceto a necrose, foram observadas com maior frequência relativa nos tres grupos expostos à água do Rio Iguaçu.

O grupo exposto à água poluída sem diluição apresentou o maior grau de extensão das alterações morfológicas exceto para a esteatose, a qual foi encontrada em maior extensão no grupo controle (Tabela 4). A hemorragia foi a lesão de menor frequência relativa e de menor grau de extensão em quase

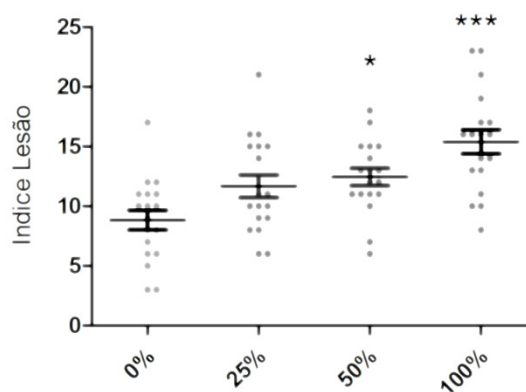
todos os grupos exceto no grupo controle onde a dilatação dos sinusoides foi a de menor grau de extensão (Tabela 4).

Figura 8 - Grau de extensão das alterações morfológicas avaliadas no fígado de *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu, por indivíduo.



FONTE: O Autor (2017)

Figura 9 - Índice histopatológicos observados no fígado de *Oreochromis niloticus* em indivíduos expostos a várias diluições da água do Rio Iguaçu.



FONTE: O Autor (2017)

NOTA: Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Asteriscos indicam diferença estatística (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). (n = 72).

A avaliação das lesões mediante o índice de Bernet (Figura 9) demonstrou diferenças significativas dos grupos expostos à água poluída (50%) e sem diluição ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente).

5.4 ANÁLISES DE GENOTOXICIDADE

5.4.1 Ensaio Cometa em eritrócitos

Todos os grupos expostos à água do Rio Iguaçu mostraram danos ao DNA dos eritrócitos, sendo maior a significância da diferença em relação com o grupo Controle nos grupos com diluição de 50% e sem diluição (100%) ($p < 0.001$). No grupo exposto à água do Rio Iguaçu com diluição de 25% a significância da diferença em relação com o grupo Controle foi $p < 0.01$ (Figura 10A).

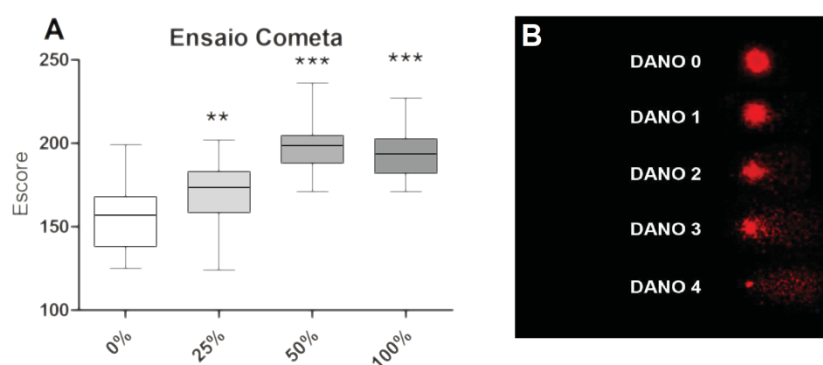
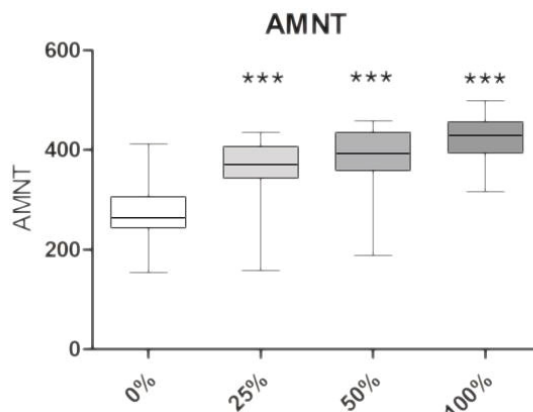


Figura 10 - Biomarcadores de genotoxicidade em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*

A. Danos ao DNA em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, detectados por ensaio cometa a partir do score das classes de 0 a 4. B. Nucleóides com danos de 0 a 4, utilizado na classificação para análise do ensaio cometa. Comparação entre o grupo controle e os grupos expostos a água do Rio Iguaçu. Valores expressos em média \pm erro padrão da média. N = 40. Asteriscos indicam diferença estatística (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) na comparação com o grupo Controle.

5.4.2 Contagem de micronúcleos em eritrócitos

Figura 11 - Número de alterações morfológicas nucleares totais (AMNT) em 2000 eritrócitos de *Oreochromis niloticus*.

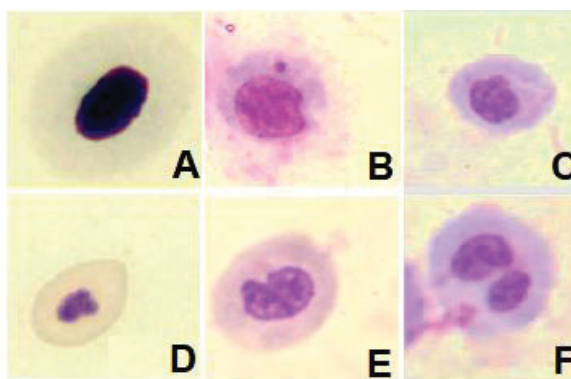


FONTE: O Autor (2016).

NOTA: Comparação entre o grupo controle e os grupos expostos a água do Rio Iguaçu. (n = 40). Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Asteriscos indicam diferença estatística (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) na comparação com o grupo Controle. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Ao ser comparada a existência de AMNT (alterações morfológicas nucleares totais) (Figura 11) foi observado que o grupo controle diferiu dos outros três tratamentos ($p < 0,001$) contando com um número menor significativamente de alterações morfológicas nucleares totais. Foi observado em todos os grupos expostos à água poluída as seguintes alterações morfológicas nucleares: micronúcleo, “Blebbbed”, “Lobed”, “Notched” e “Binúcleo” (Figura 12).

Figura 12 - Eritrócitos de *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu.



FONTE: O Autor (2016)

LEGENDA: (A) Célula com Núcleo Normal, (B) célula com micronúcleo, (C) “Blebbbed”, (D) “Lobed”, (E) “Notched”, (F) Célula com Binúcleo”. (Aumento de 1000x).

A quantidade observada de micronúcleos (total de 5 apenas) não foi relevante para a análise estatística. Quando comparadas as frequências das alterações tipo “Binúcleo” e “Lobed”, também não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Quando comparados os tratamentos em relação a alterações do tipo “Blebbbed”, foi observada diferença significativa entre o Grupo Controle e os tratamentos 50% e 100% ($p < 0,001$). Também foi observada diferença significativa nas alterações do tipo Notched entre o Grupo Controle e os outros três tratamentos: 25% ($p < 0,01$), 50% e 100% ($p < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequências relativas das alterações morfológicas nucleares avaliadas nos eritrócitos de *Oreochromis niloticus* em indivíduos expostos à várias diluições da água do Rio Iguaçu.

	Micronúcleo	Blebbbed	Lobed	Notched	Binúcleo
Controle	0.00	4.55± 0.17	2.20± 0.06	6.72± 0.38	0.52± 0.12
G. 25%	0.00	5.19± 0.20	2.16± 0.07	10.77± 0.55**	0.58± 0.1
G. 50%	0.00	5.59± 0.12***	2.19± 0.07	11.34± 0.57***	0.66± 0.1
G. 100%	0.01	6.35± 0.11***	2.35± 0.10	11.32± 0.35***	0.89± 0.1

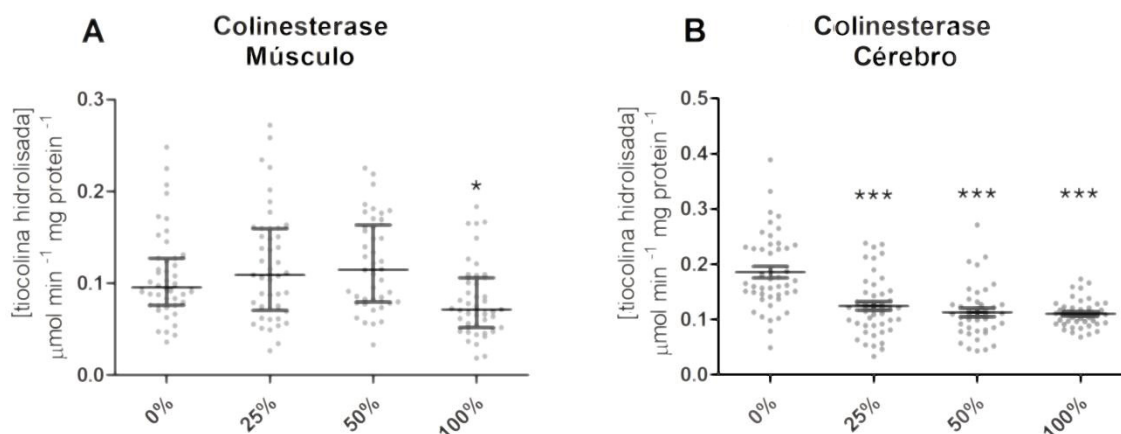
FONTE: O Autor (2016).

NOTA: Valores expressos em média ± erro padrão da média. N = 160. Asteriscos indicam diferença estatística (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) na comparação com o grupo Controle. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.5 ANÁLISES DE NEUROTOXICIDADE

As análises bioquímicas para avaliação da atividade específica da acetilcolinesterase (AChE) demonstraram que no tecido muscular ocorreu uma inibição significativa ($p < 0,05$) da atividade colinesterásica nos indivíduos expostos à água não diluída (100%) do Rio Iguaçu (Figura 13A). Enquanto que a atividade colinesterásica no cérebro diminuiu significativamente ($p < 0,001$) em todos os grupos experimentais em relação com o grupo Controle (Figura 13B).

Figura 13 - Atividade da colinesterase em *Oreochromis niloticus* expostos a diferentes diluições água do Rio Iguaçu.



FONTE: O Autor (2016).

LEGENDA A. – Atividade colinesterase no músculo; B. – Atividade da colinesterase no cérebro.

NOTA: Asteriscos indicam diferença estatística (* = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$) na comparação com o grupo Controle. (n = 182). Os resultados expressos em média \pm erro padrão da média. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.6 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

A atividade específica da Catalase é demonstrada na Figura 14A, onde é possível observar uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da atividade enzimática nos indivíduos expostos à água com diluição de 25% do Rio Iguaçu em relação ao grupo Controle. Assim como, um aumento significativo ($p < 0,001$) da atividade nos peixes expostos à água sem diluição (100%) em relação ao grupo Controle.

Na atividade específica da Glutathione-S-transferase (Figura 14B) é observada uma diminuição significativa ($p < 0,001$) da atividade enzimática nos indivíduos expostos a água com diluição de 25% do Rio Iguaçu em relação ao grupo Controle. Assim como, aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade no grupo exposto à água sem diluição (100%) em relação ao grupo Controle.

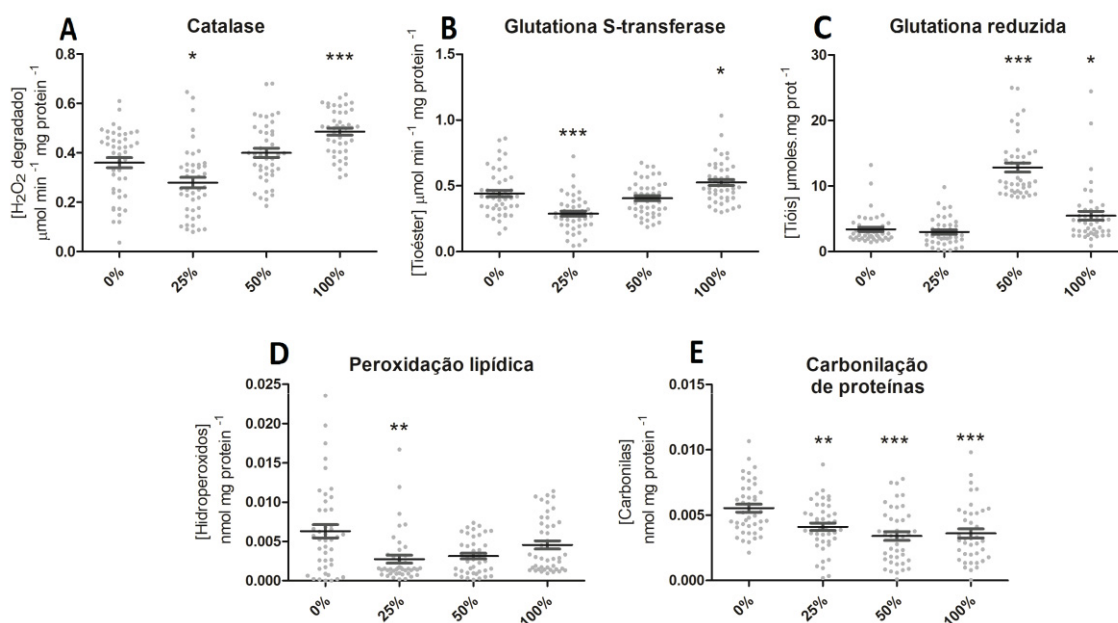
A glutathione reduzida é gerada como resposta ante o estresse oxidativo. Para este tiol não protéico foi observado um aumento significativo ($p < 0,001$ e

$p < 0,05$ respectivamente) nos grupos expostos à água com diluição de 50% e sem diluição (100%) em relação ao grupo Controle (Figura 14C).

Na avaliação da concentração de hidroperóxidos, gerados pela peroxidação dos lipídeos (Figura 14D). É observada uma diminuição significativa ($p < 0,01$) no grupo experimental exposto à água com diluição de 25% em relação ao grupo Controle. Os outros grupos experimentais não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo Controle.

Avaliando a concentração de proteínas carboniladas, geradas pelo processo de estresse oxidativo (Figura 14E), foi observada uma diminuição significativa em todos os grupos experimentais expostos à água do Rio Iguaçu em relação ao grupo Controle.

Figura 14 - Biomarcadores hepáticos de estresse oxidativo no *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu.



FONTE: O Autor (2017).

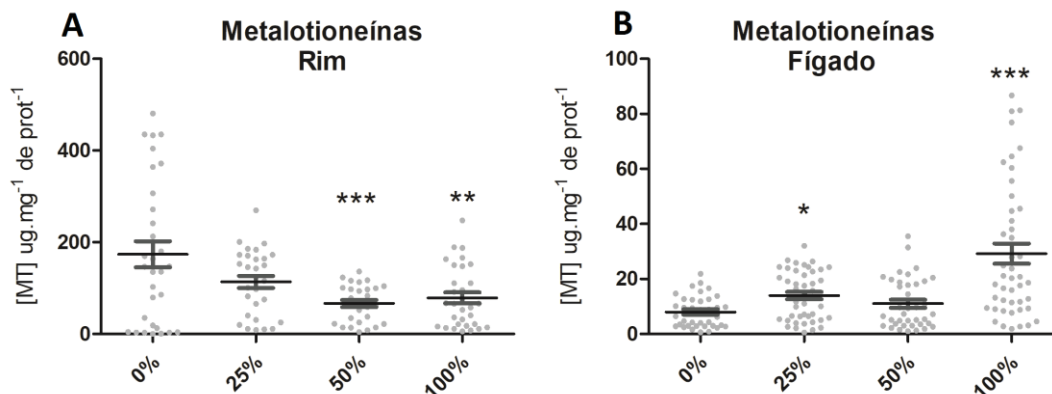
LEGENDA: A. - Atividade da Catalase. B. - Atividade da Glutathione S-Transferase. C. - Glutathione Reduzida. D. - Peroxidação lipídica. E. - Carbonilação proteica.

NOTA: Resultados expressos em média \pm erro padrão. Asteriscos indicam diferença estatística (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) em comparação com o grupo Controle. (n = 182). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.7 QUANTIFICAÇÃO DE METALOTIONEINAS

No caso do Rim (Figura 15A) foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,01$) das concentrações de metalotioneínas nos grupos expostos à água sem diluição (100%) e diluído a 50% em relação ao grupo Controle. No fígado (Figura 15B) é observado um aumento significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) nos grupos expostos à água sem diluição (100%) e diluída à 25% em relação ao grupo Controle.

Figura 15 - Concentração de Metalotioneínas em *Oreochromis niloticus* expostos a várias diluições da água do Rio Iguaçu.



FONTE: O Autor (2017).

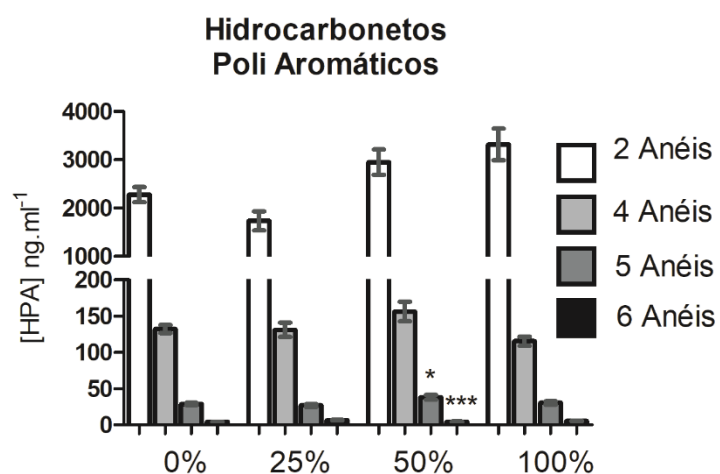
LEGENDA: A– Tecido renal; B – Tecido hepático.

NOTA: Resultados expressos em média \pm erro padrão. Asteriscos indicam diferença estatística (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$) na comparação com o grupo Controle. (n = 182). Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

5.8 ANÁLISES HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM BILE

Foram realizadas análises para avaliação da concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com Dois, Quatro, Cinco e Seis anéis na bile, (Figura 16). No caso dos hidrocarbonetos com Cinco e Seis anéis foi observado um aumento significativo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ respectivamente) no grupo experimental com diluição de 50% em relação ao grupo Controle. Para os demais tipos de hidrocarbonetos restantes ou para as concentrações totais não foram encontradas diferenças significativas em relação ao grupo Controle.

Figura 16 - Concentração média de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos de 2 a 6 anéis de bile de *Oreochromis niloticus* expostos à água do Rio Iguaçu.



FONTE: O Autor (2017).

NOTA: Resultados expressos em média \pm desvio padrão. (n = 60). Asteriscos indicam diferença estatística (* = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$) na comparação com o grupo Controle. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

6. DISCUSSÃO

As concentrações dos metais e organoclorados encontradas nas amostras da água do Rio Iguaçu não foram maiores do que aquelas recomendadas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Res. 357/2005 para as águas doces de classe I e II. Entretanto, os metais Cu e Mn apresentaram concentrações muito próximas aos limites recomendados por esta agência. Estudos têm evidenciado que os peixes de pequeno porte (LIU *et al.*, 2006; MELA *et al.*, 2013) e em estágios iniciais de desenvolvimento (HUTCHINSON; SOLBE; KLOEPPER-SAMS, 1998; FREIRY *et al.*, 2014) apresentam uma maior sensibilidade aos poluentes presentes no meio ambiente, mesmo estes estando abaixo dos limites estabelecidos.

A alta concentração destes dois metais no Rio Iguaçu, pode ser causada pelo lançamento contínuo de lixo urbano, visualizado durante toda a coleta de água. Também pode ser causada pelo derramamento de resíduos não tratados oriundos das indústrias e esgotos domésticos (SCHNITZLER, 2008).

Os organoclorados e PCBs mostraram concentrações baixas, bem próximas ou abaixo do limite de detecção do método e abaixo dos limites de qualidade ambiental preconizados na Resolução 357/2015 do CONAMA. Os HPAs (naftalenos e derivados alquilados) também mostraram concentrações baixas, entretanto a Resolução 357/2015 do CONAMA não tem estabelecido os limites máximos permitidos nas águas superficiais. De maneira geral, ainda não se conta com informações adequadas para determinar os limites seguros destes compostos em organismos aquáticos (USEPA, 2012). Entretanto, NAGPAL (2007) relata que, as concentrações máximas do naftaleno e seus derivados alquilados não podem ser maiores do que $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas doces superficiais. Todos estes compostos orgânicos são hidrofóbicos e podem ser adsorvidos pelo sedimento ou por partículas em suspensão. Ainda, adiciona-se ao fato de que a coleta foi no verão, quando o aumento das chuvas favorece a diminuição das concentrações das substâncias na água pelo aumento do volume da água carregada pelo rio.

Os índices de crescimento não foram afetados durante o decorrer do experimento. Os índices somáticos indicam o estado de saúde geral dos peixes, possíveis distúrbios na alimentação, alocação de energia no fígado e produção de gametas (SILVA, 2010). Entre eles o fator de condição (K) está relacionado particularmente com a alimentação, presença de contaminantes e saúde do animal (CAMARA; CARAMASCHI; PETRY, 2011).

A similaridade entre os diferentes índices de crescimento indicam que as condições nutricionais foram mais determinantes para a saúde geral dos grupos experimentais do que a influência do contato com contaminantes, sendo este resultado respaldado por outros estudos (SILVA, 2010; AMEUR *et al.*, 2015). Outro fator que pode afetar os índices de crescimento é o período reprodutivo que pode reduzir ou interromper o crescimento para favorecer a reprodução (CAMARA; CARAMASCHI; PETRY, 2011). No caso deste estudo, foram utilizados peixes juvenis, os quais não alcançaram a maturidade reprodutiva, e, portanto, os índices de crescimento não foram afetados por este fator.

Os valores de IHS nos diferentes grupos experimentais foram estatisticamente iguais. Variáveis como a idade, a alimentação, a condição fisiológica, as infecções e a presença de substâncias poluentes podem contribuir para a ocorrência de variações no tamanho do fígado em peixes (TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2000). Este órgão estoca grande quantidade de gordura e glicogênio (VICENTINI *et al.*, 2005), que são componentes energéticos importantes na manutenção da homeostasia, principalmente durante condições adversas. Entretanto, mesmo que os índices de crescimento não tenham sido afetados pela presença de poluentes na água do Rio Iguaçu, foi possível observar através dos demais biomarcadores que as condições fisiológicas destes exemplares foram alteradas.

O epitélio da brânquia é a principal superfície de contato com o ambiente e constitui um importante alvo dos poluentes presentes na água, devido à sua extensa área superficial (WONG; WONG, 2000). Nesse sentido, a análise das alterações histológicas das brânquias dos teleósteos causadas pela exposição á poluentes tem merecido um interesse crescente em estudos de toxicologia (KAUR; KAUR; KAUR, 2016; MELA *et al.*, 2013).

A ocorrência de proliferação nas células de muco e a diminuição das microdigitações observadas estão relacionadas a um mecanismo de proteção em situações de injúria causada por contaminantes aquáticos ou respostas de estresse devido a exposições agudas e/ou crônicas (FERNANDES *et al.*, 2013).

As microdigitações são estruturas responsáveis pela distribuição do muco sobre o epitélio. WONG e WONG (2000) observaram a redução do número de microdigitações nas brânquias de *Oreochromis mossambicus* afeitadas por diferentes concentrações de cádmio. BIAGINI; DAVID e FONTANETTI, (2009) encontraram a redução destas estruturas em células pavimentosas das tilápias que cresceram em águas poluídas tratadas com flutuação (processo que permite a remoção de uma maior quantidade de matéria não dissolvida das águas residuais). CORREIA *et al.* (2017) confirmaram que a perda de densidade das microdigitações ante a exposição de *O. niloticus* ao vinhoto de cana de açúcar é uma resposta regressiva aos poluentes que chegam ao epitélio branquial.

A exposição ao Cu em condições similares a este bioensaio gerou a perda parcial destas estruturas (MELA *et al.*, 2013). Necrose em células pavimentosas ocorreu quando as tilápias foram expostas ao Pb (ALDOGHACHI *et al.*, 2016) provocando o desaparecimento das microdigitações. Outra causa possível da perda das microdigitações é a interferência dos poluentes na estrutura do citoesqueleto resultando na perda da sua integridade (SILVA, 2010). A exposição ao Cu nas brânquias altera as concentrações de actina, pois provoca a diminuição da expressão da proteína e a ativação de uma série de proteases que hidrolisam os filamentos de actina e as proteínas que ancoram estes na membrana. Assim também aumenta a produção das EROs as quais modificam, mediante a carbonilação, as proteínas do citoesqueleto actina e tropomiosina, provocando a perda da sua funcionalidade (CHEN; CHAN, 2009; EYCKMANS *et al.*, 2012).

Uma maior secreção de muco em situações de estresse ocorre com o intuito de minimizar o contato do tecido afetado com a água e consequentemente o contato com os poluentes. De acordo com DE OLIVEIRA e FONTANETTI (2009) a hipersecreção de muco é uma resposta à presença

de poluentes na água. Tem sido demonstrada a ativação da secreção de muco pela presença de contaminantes na água; principalmente metais como: Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni e Zn (PEEBUA *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2008; AUTHMAN *et al.*, 2015; RAJESHKUMAR *et al.*, 2017); metil metsulfuron 10.1% + etil clorimuron 10.1% (SAMANTA *et al.*, 2015); pesticidas organoclorados como Aldrina, dieldrina, DDT, hexaclorobenzeno e clordano (SATYANARAYAN; KOTANGALE; VERMA, 2012) e medicamentos como carbamazepina (MALARVIZHI *et al.*, 2012) Os mecanismos que permitem a ativação das células secretoras de muco podem ser o aumento do número de células (REDDY *et al.*, 2013) e a hipertrofia celular (KUMAR *et al.*, 2017).

A produção excessiva de muco, que conseqüentemente acarreta no aumento da distância de difusão entre o contaminante e o vaso sanguíneo, reduzindo a eficiência respiratória e as demais funções branquiais e interfere por fim no comportamento do animal (SATYAVARDHAN, 2013).

Desta maneira, os resultados da ultraestrutura das brânquias demonstram que a exposição dos organismos à água do rio Iguaçu provoca mudanças e alterações significativas, fato respaldado por estudos que ligam presença de poluentes na água com estas lesões (LUPI *et al.*, 2007; MELA *et al.*, 2013; KAUR; KAUR; KAUR, 2016).

O fígado, como principal órgão de metabolismo e desintoxicação em vertebrados, é um dos principais alvos dos xenobióticos, e também um dos órgãos que mais apresenta danos histopatológicos quando exposto aos xenobióticos. A ocorrência de áreas de necrose no fígado resultou na lesão mais evidente neste estudo, com frequências maiores que 94% em todos os grupos analisados.

Uma vez que o Rio Iguaçu e seus afluentes percorrem a região metropolitana de Curitiba, acaba contaminando os organismos aquáticos e conseqüentemente a população seja diretamente pela água ou pela cadeia alimentar via bioacumulação. Pesticidas, dioxinas e HPAs estão associados com o aumento da concentração de radicais livres no citosol, o que leva a peroxidação lipídica, lesionando as membranas celulares e deixando a célula mais susceptível à morte celular programada ou perda de homeostase e

necrose. (MELO, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2005; SHAH; KOTHARI; PARIHAR, 2017). Tanto a ocorrência, como as altas frequências relativas desta lesão, considerada irreversível, assemelham-se com outros estudos realizados em áreas com alto impacto de poluição (FERNANDES *et al.*, 2008; FERNANDEZ *et al.*, 2011; ANDRADE BRITO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2017).

A ocorrência de necrose no fígado pode ativar a resposta inflamatória no organismo, levando a um aumento no recrutamento de células de defesa nos tecidos onde tenha ocorrido o dano (SILVA, 2008; SILVA, 2010; AGAMY, 2012). A infiltração de leucócitos observada nestas áreas é parte da resposta inata do sistema imune diante do comprometimento das membranas celulares. Suas funções estão relacionadas a neutralização e destruição da fonte agressora, realizando a limpeza do tecido, retirando o agente agressor e células mortas, além de induzir a recuperação do tecido lesado (BERNET *et al.*, 1999). Uma exposição prolongada aos compostos xenobióticos pode promover a continuada ativação do sistema inato imune, gerando maior dano no tecido pela contínua liberação de mediadores bioquímicos pró-inflamatórios (IL-1 e TNF α) (GUNAWAN; KAPLOWITZ, 2007). A resposta imunológica que se ativa para conter os danos causados pelos xenobióticos termina gerando maior acúmulo de danos no tecido.

A necrose, em combinação com a resposta inflamatória, está ligada à hemorragia e a dilatação sinusoidal no tecido hepático (SILVA, 2010; OSMAN, 2012). O dano no tecido hepático provoca fragilização e quebra dos vasos sanguíneos e, por consequência, a saída das células sanguíneas para o tecido hepático. Durante o processo inflamatório são liberados mediadores químicos como IL-6 e VEGF, os quais provocam a dilatação dos sinusóides e sua congestão sanguínea (MARZANO *et al.*, 2015). Estudos sinalam que poluentes como o DBP (ERKMEN *et al.*, 2017) e o estradiol (MARZANO *et al.*, 2015) podem ocasionar a dilatação dos sinusóides sem mediar diretamente o processo inflamatório.

Os grupos expostos à água poluída do Rio Iguaçu apresentaram maiores frequências relativas de infiltração leucocitária, dilatação sinusoidal e

hemorragias. O resultado demonstra que o sistema imunológico destes animais precisou ser ativado, pois não conseguiu conter o dano tissular.

Outros estudos também encontraram respostas semelhantes em peixes expostos a ambientes poluídos com esgotos de cidades, pesticidas usados na agricultura e resíduos de metais pesados, (SILVA, 2008; POLEKSIC *et al.*, 2010; OSMAN, 2012; LIEBEL; TOMOTAKE; RIBEIRO, 2013; Osorio *et al.*, 2014).

Os grupos expostos à água do Rio Iguaçu apresentaram maiores frequências de esteatose. Essa acumulação de lipídeos no fígado pode estar ligada com o papel do órgão no metabolismo de xenobióticos. Os peixes acumulam muitos poluentes preferencialmente em seu tecido adiposo e no fígado, sendo os efeitos evidentes quando as concentrações atingem um nível limiar (ABDEL-KHALEK, 2015). Os peixes apresentam capacidade relativamente baixa para metabolizar substâncias xenobióticas, fato que aumenta a tendência de sua acumulação nos hepatócitos (OLIVARES-RUBIO; VEGAS-LÓPEZ, 2016).

A esteatose hepática pode ser definida arbitrariamente como o ponto em que as membranas hepatocelulares parecem desintegrar-se visivelmente, resultando na fusão dos glóbulos gordurosos dos hepatócitos vizinhos, mesmo essa manifestação extrema pode não ser prejudicial (ou irreversível) em todos os peixes (WOLF e WOLFE, 2005).

Estudos demonstram que alguns poluentes geram uma acumulação lipídica visível nos hepatócitos, como, óleos, pesticidas e metais (AGAMY, 2012; SAMANTA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014).

Organismos analisados em estudos ecotoxicológicos em ambientes poluídos com esgoto, lixo urbano e industrial e produtos orgânicos utilizados na agricultura também mostraram respostas semelhantes de acumulação lipídica (SILVA, 2008; ANDRADE BRITO *et al.*, 2012; OSMAN, 2012; YAMAMOTO *et al.*, 2016).

O índice de lesão hepática foi mais elevado no grupo exposto à água do Rio Iguaçu sem diluição, mostrando um alto grau de dano no órgão comparado

com o controle. As lesões inflamatórias (infiltração de leucócitos) e circulatórias (sinusoides dilatados) foram as que mais incidiram nesta diferença. MELA *et al.*, (2013) também encontraram o aumento do índice lesão hepática durante a exposição de *Rhamdia quelen* ao Cu em concentrações semelhantes a este bioensaio mostrando alta frequência de necrose, infiltração leucocitária e esteatose hepática.

O ensaio cometa e contagem de micronúcleos em peixes têm sido utilizados para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos de diversas regiões do planeta impactadas pelo despejo de efluentes gerados pelo ser humano (GONZÁLEZ-MILLE *et al.*, 2010; AMEUR *et al.*, 2015). Neste trabalho foi observado que as alterações morfológicas nucleares apresentam diferenças significativas quando comparamos as diferentes diluições da água coletada do Rio Iguaçu com o controle negativo, o que poderia indicar um potencial mutagênico dos compostos tóxicos presentes na água. Este possível potencial se refletiu na análise das alterações com um aumento significativo da frequência das alterações morfológicas nucleais totais (AMNT) ao aumentar a exposição à água do rio. Estes resultados estão de acordo aos do IAP de 2005, quanto ao Índice de Preservação das Comunidades Aquáticas (IPCA), que classificou as águas do Rio Iguaçu como de qualidade inadequada no ponto de amostragem perto do ponto da coleta utilizado nesta pesquisa.

A partir das análises dos eritrócitos submetidos ao ensaio cometa, constatou-se grande quantidade de danos ao DNA, demonstrando um aumento gradual no número de células com maiores classes de danos (três e quatro) acompanhando o aumento da exposição à água do Rio nos tratamentos. Estas observações foram corroboradas com os altos escores obtidos nestes grupos, que demonstraram potencial genotóxico dos tratamentos em comparação com o controle negativo. Segundo COLLINS (2009), eventos que são constatados pelo ensaio do cometa são considerados lesões potencialmente pré-mutagênicas, pois ainda podem ser reparadas pelo sistema de reparo do DNA. Estes resultados corroboram com pesquisas anteriores, as quais demonstram que os peixes são considerados bons indicadores para a detecção de contaminantes genotóxicos presentes nos corpos da água (GONZÁLEZ-MILLE *et al.*, 2010; PEREIRA, 2014).

Espécies onívoras como o *Oreochromis niloticus* apresentam maior dano no DNA que espécies com comportamento carnívoro ou herbívoro, devido ao fato dos organismos onívoros poderem incorporar múltiplos poluentes biodisponíveis de várias fontes devido às suas preferências alimentares, que são ainda mais limitadas nos organismos carnívoros e herbívoros (GONZÁLEZ-MILLE *et al.*, 2010).

Estudos sinalam que vários dos poluentes encontrados anteriormente na água do Rio Iguaçu ou seus afluentes geram danos na estrutura dos núcleos, cromossomos e particularmente na molécula do DNA. A espécie *Rhamdia quelen* foi afetada pela presença de atrazina, mostrando efeitos deletérios ao DNA, através do teste do micronúcleo písceo (PIANCINI, 2011), mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira. *Astyanax altiparanae* foi sensível aos efeitos deletérios dos compostos organoclorados (VIEIRA *et al.*, 2017). HPAs como o Dibenzo[a,h]antraceno induziram danos significativos no DNA em ensaios em *Cyprinus carpio* (KIM; KIM, 2016). Assim como um poluente emergente do grupo dos produtos de higiene pessoal, Triclosan, em *Dreissena polymorpha* (PAROLINI *et al.*, 2013).

Vários poluentes são descritos pela literatura por alterar o núcleo e o DNA dos eritrócitos do gênero *Oreochromis spp.* Um herbicida como a trifluralina e um composto orgânico dinitroanilina que atua como inibidor da mitose promoveu danos no DNA em *Oreochromis niloticus*, com formação significativa de nucleóides com caudas (FERNANDES, 2005). Nesta mesma espécie GONZÁLEZ-MILLE *et al.* (2010) demonstraram que ambientes poluídos com o PCBs, DDT, HCB e outros com anéis benzênicos causam um alto grau de danos no DNA. Os ambientes poluídos com metais como Cu, Zn, Pb, Fe e Mn (OMAR *et al.*, 2012) também mostraram resultados similares em *Oreochromis niloticus*.

Zonas agrícolas poluídas com pesticidas (VIEIRA *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2017), áreas urbanas poluídas com esgoto e despejos industriais (ERGENSE *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2017) são exemplos de ambientes complexamente poluídos que causam genotoxicidade.

Das moléculas que danificam o DNA os metais são os mais estudados. Os metais como o Cu, Fe, Mn e Ni catalisam as reações que geram espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, ânions superóxido e radicais hidroxílicos, o que pode levar ao estresse oxidativo ambiental e ao dano no DNA (SEVCIKOVA *et al.*, 2011). Além disso, os radicais livres poderiam estimular a atividade da endonuclease endógena (OMAR *et al.*, 2012). As proteases obliteram as histonas e expõem todo o comprimento do DNA às nucleases provocando a fragmentação da cromatina levando a célula aos procesos de apoptose e necrose.

Segundo MORALES *et al.* (2016) os metais também alteram significativamente o mecanismo de célula para reparar a quebra do DNA. Observaram que o Ni, Cd e As podem inibir a recombinação homóloga e a reparação de fita simple promovendo a recombinação mutagênica.

O Endossulfân em *Danio rerio* (SHAO *et al.*, 2012) provoca a formação de adutos de DNA em baixas concentrações. O naftaleno em *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp.* (RAMSDORF, 2011) precisa ser metabolizado para danificar o DNA das células. A biotransformação ocorre fundamentalmente pelo sistema CYP dos microsossomos (GAUTHIER *et al.*, 2014). Os compostos resultantes, mais hidrofílicos, podem formar adutos como as bases do DNA, podendo induzir mutações, quebra das cadeias e alterações dos cromossomos (ABDEL-SHAFFY; MANSOUR, 2016).

Nosso estudo mostrou os efeitos da poluição da água do Rio Iguaçu nos eritrócitos da tilápia do Nilo. O contato com esta água causou danos significativos nos eritrócitos desde as concentrações mais baixas, sendo prejudicial para os organismos que dependem diretamente ou indiretamente desta água. SANTOS *et al.* (2010) em *Gasterosteus aculeatus*; MELA *et al.* (2013) em *Rhamdia quelen* e SIMONATO *et al.* (2016) em juvenis de *Prochilodus lineatus* observaram, baseados no ensaio cometa, o aumento de danos significativos no DNA dos eritrócitos quando os peixes foram expostos a concentrações de Cu semelhantes e inclusive menores ao esse bioensaio.

FERNANDES (2008) e SILVA (2015) reportaram a presença de vários químicos inibidores da enzima acetilcolinesterase na água do Rio Iguaçu e

seus afluentes. Ao passar pela Região Metropolitana o Rio é poluído por conta da zona industrial onde se utilizam metais que têm ação inibidora da enzima acetilcolinesterase. A exposição a soluções com Cd, Hg e Zn afetaram a atividade da acetilcolinesterase cerebral segundo ARAUJO *et al.* (2016). Sobre o tecido muscular, outros estudos também confirmam a atividade inibitória desses poluentes da enzima acetilcolinesterase neste tecido (COSTA *et al.*, 2007; PICCO; BOGGIO; RODRÍGUEZ, 2010). Também o Cu apresentou ação inibitória em *P. lineatus* em concentrações de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ (SIMONATO *et al.*, 2016).

Os metais têm variados mecanismos para a inibição da enzima acetilcolinesterase nos diferentes tecidos do organismo. Estudos *in vivo* demonstraram que o Pb e Mercúrio (Hg) têm a habilidade de interagir com os receptores muscarínicos da acetilcolina (BONDY; AGRAWAL, 1980; COSTA, 2003), bloqueando a sua ligação ao neurotransmissor. Como resultado existe uma acumulação da molécula, o que resulta na inibição por substrato da enzima Acetilcolinesterase (REED; LIEB; NIJHOUT, 2010). O Hg também pode inibir *in vivo* a enzima, pois o metal induz a agregação da proteína mediante a ligação com os grupos tióis das cadeias laterais dos aminoácidos (FRASCO *et al.*, 2007).

Também, foram associados pesticidas organofosforados (ASSIS *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2016) e carbamatos (ENSIBI *et al.*, 2014; ARAUJO *et al.*, 2016) como inibidores para a enzima em cérebro e músculo de peixes.

Estes compostos inibem a enzima mediante a sua união ao grupo hidroxil da serina presente no sítio ativo da enzima bloqueando o acesso da acetilcolina, o substrato da enzima (BOELSTERLI, 2007). Os organofosforados são ligados covalentemente na serina, e esta ligação é irreversível (COLOVIC *et al.*, 2013) se diferenciando dos carbamatos onde a ligação com a serina é reversível (BOELSTERLI, 2007).

Nesse estudo foi observado que a acetilcolinesterase de cérebro e músculo no *Oreochromis niloticus* têm diferença de sensibilidades aos inibidores. Anteriormente RODRÍGUEZ-FUENTES e GOLD-BOUCHOT (2004) sinalaram que a concentração onde o 50% da enzima nesses peixes fica inibida (IC_{50})

para a Acetilcolinesterase no cérebro é menor que para a enzima no músculo para vários inibidores. ALBENDÍN-GARCÍA, (2009) observou que para *Sparus aurata* depois das 24h de exposição aos inseticidas organofosforados Azinfosmetil, ometoato e paration, a inibição da atividade da Acetilcolinesterase do cérebro foi maior que a do músculo.

Jenynsia multidentata exposto ao endosulfan apresentou uma diminuição da atividade da enzima no cérebro e músculo (BALLESTEROS *et al.*, 2009) O endosulfan também alterou a atividade natatória de *Danio rerio* pela inibição da enzima do cérebro (PEREIRA *et al.*, 2012).

Outros autores encontraram também diminuições significativas na atividade das acetilcolinesterases de cérebro e músculo quando os organismos foram expostos às misturas complexas. *O. niloticus* mantidas durante 6 meses em um reservatório próximo à áreas com intensiva atividade agrícola e agropecuária e polos industriais, também mostraram a diminuição da atividade da enzima Acetilcolinesterase no cérebro (SANTOS, 2013). GHISI *et al.* (2017) observaram também semelhantes resultados nos dois tecidos em *Astyanax aff. paranae* capturados em dois pontos, o primeiro rodeado de atividade agrícola e o segundo recebendo esgoto e despejos industriais de uma zona urbana.

Desta maneira é possível observar que a diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase neste estudo é compatível com os estudos anteriormente mencionados, pois o bioensaio foi realizado a partir das amostras procedentes de uma área altamente poluída com despejos industriais, pesticidas utilizados para a eliminação de pragas e lançamento de esgotos parcialmente tratados, demonstrando uma sensibilidade maior no tecido cerebral.

Diversos estudos em biomonitoramento também relacionam o aporte de muitas classes de poluentes com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais reagem com macromoléculas críticas promovendo efeitos nocivos como carbonilação de proteínas (PCO) e peroxidação de lipídeos (LPO). O desequilíbrio entre a geração das EROs e os mecanismos para eliminar-las é nomeado Estresse Oxidativo (JONES, 2006). Na LPO podem surgir várias reações bioquímicas em cadeia, e na PCO ocorre à formação dos grupos que alteram a conformação proteica e tendem a torná-las

mais hidrofóbicas e resistentes à hidrólise (NIKI, 2014; DAVIES, 2016; CIPAK-GASPAROVIC *et al.* 2017). Deste modo, o aumento da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas pode resultar em diversos danos às membranas celulares, enzimas, DNA e diversas outras biomoléculas importantes na célula (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003; KIM; RYU, 2013).

As EROs são induzidas pela exposição dos peixes as substâncias como os metais de transição (VALLE, 1972; PEREIRA, 2014), moléculas orgânicas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pesticidas (MODESTO; MARTINEZ, 2010; DE OLIVEIRA, 2013) e misturas complexas de poluentes na água (SANTOS, 2013; GHISI *et al.*, 2017).

Os metais com potencial Redox, como Fe e Cu, geram EROs através do ciclo redox e reação de Fenton. Metais sem potencial redox, como o Ni prejudicam as defesas antioxidantes, especialmente aquelas que envolvem antioxidantes e enzimas que contêm tiol (SEVCIKOVA *et al.*, 2011). Outros como o Mn podem oxidar a H_2O_2 a radical OH^\bullet , altamente reativo (MARTINEZ-FINLEY *et al.*, 2013).

Para diminuir a geração das EROs, o organismo ativa várias enzimas e outros compostos que reduzem as concentrações das moléculas oxidantes. A superóxido dismutase (SOD) reduz o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerando O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta última ERO tem menor taxa de reação com proteínas e lipídeos. O peróxido de hidrogênio vai ser reduzido mediante a atividade de duas enzimas com altas concentrações no fígado: A catalase (CAT) e a Glutathione peroxidase (GPx) dependente de Selênio e também o cofator GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A CAT é uma enzima localizada nos perioxossomos que se encarrega de fazer a conversão de altas concentrações de H_2O_2 em água e oxigênio. Quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais), entretanto, a GPx é que se encarrega de transformá-lo em água. Outros tipos de EROs como radical hidroxil (OH^\bullet), ácido hipocloroso (HOCl), peroxinitrito ($ONOO^-$), e alquila (RO_2^\bullet) podem ser neutralizadas mediante a ação direta da GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A entrada dos xenobióticos na célula aumenta a síntese e a indução das enzimas envolvidas na sua biotransformação em moléculas mais hidrofílicas que possam ser excretadas do organismo. O fígado tem papel central neste processo. Na Fase I ocorre a funcionalização do xenobiótico que se modifica algum grupo químico funcional. Como seguinte passo (Fase II) o composto é conjugado com moléculas as que aumentam a sua hidrofiliidade (BOELSTERLI, 2007). A glutathione – S – transferase (GST) é uma das enzimas com maior quantidade de substratos, os quais são conjugados com GSH, o cofator utilizado pela enzima (BERNDT; LILLIG; FLOHÉ, 2014). A atividade da GST é importante no estado de estresse oxidativo, pois pode competir com a GPx pela utilização da GSH e também diminuiria a capacidade do tri-peptídeo para neutralizar as EROs (HALLIWELL, 2007).

Nos grupos expostos a diluições de 25%, a ação das enzimas SOD-GPx provavelmente foi capaz de evitar danos às proteínas (PCO) e lipídios (LPO) sem aumentar a atividade do CAT. Também o consumo de GSH por GPx pode não ser suficientemente alto para diminuir as concentrações do tripéptido reduzido.

Os peixes expostos às diluições de 50% pudesse ter tido um aumento na produção de EROs comparado com o grupo exposto ao 25% da água do rio, possivelmente ativando a via SOD – GPx. A enzima CAT mostra-se com maior atividade ao ser comparada com o grupo anterior, mas ainda pudesse não ser fundamental para a redução das concentrações das EROs geradas. Assim também a GST pudesse não ter concentrações suficientes de substratos para aumentar significativamente a sua atividade. O sistema de produção da GSH e a redução da GSSG consumida pudesse de ter aumentado para fornecer a GPx e a GSH utilizada para reduzir diretamente as EROs formadas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Já com a exposição dos peixes à água sem diluição do Rio Iguaçu, foi observada um aumento significativo da atividade da CAT. LIU *et al.* (2006) detectaram aumento da atividade da CAT em *Carassius auratus* expostos a concentrações de Cu menores do que o utilizado neste trabalho. Possivelmente, também como resposta, pode ter aumentado a atividade da GST, gerando uma maior excreção de xenobióticos conjugados via renal.

A diminuição dos LPO e PCO em diferentes grupos expostos à água do Rio Iguaçu pode estar relacionado pela possível adaptação do organismo ante a produção constante das EROs durante longos períodos de tempo. Estudos sinalam que os organismos podem aumentar a eficiência dos sistemas antioxidantes que permitem a eliminação das EROs e dos sistemas de reparo que permitem a eliminação das macromoléculas e estruturas danificadas (STOREY, 1996; DAVIES, 2000; HU *et al.*, 2014).

Os indivíduos expostos à água de Rio Iguaçu com distintos níveis de diluição pudessem, portanto, estar com o sistema antioxidante ativado pela presença de poluentes biodisponíveis evitando os danos em estruturas celulares pelo estresse oxidativo. OSÓRIO (2008) observou um aumento na atividade enzimática da CAT e da GST e uma diminuição da LPO em exemplares de peixes do gênero *Astyanax* coletados num reservatório, afetado pela falta de tratamento dos esgotos domésticos, por efluentes industriais e pela atividade agrícola. CARVALHO *et al.* (2014) observaram que a exposição de *O. niloticus* juvenis durante 30 dias ao Cu não causou danos nas estruturas protéicas e lipídicas.

Porém, segundo ANDRADE BRITO *et al.*, (2012) os níveis de peroxidação lipídica inalterados poderiam não significar necessariamente a ausência de estresse oxidativo, uma vez que o estresse localizado em organelas celulares específicas pode acontecer e estar envolvido na morte celular. Neste estudo foram encontrados maiores níveis de dano no tecido hepático enquanto foi aumentando a concentração de poluentes na água, levando a considerar essa possibilidade.

As metalotioneínas (MT) têm um papel importante para a eliminação de metais tóxicos dos organismos, a regulação dos metais necessários para os processos metabólicos da célula e para redução dos EROs participando no controle do estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Estas são uma família de metaloproteínas enriquecidas em cisteína (30% do total dos aminoácidos da estrutura primária), com baixo peso molecular (de 6 até 10 KDa). Nos vertebrados pode-se encontrar metalotioneínas no Aparelho de Golgi. Estas proteínas têm a capacidade de ligar com metais pesados, sejam

fisiológicos (Zinco e Cobre) ou xenobióticos (Cádmio, Mercúrio e Prata), mediante os grupos tiois dos resíduos de cisteína (AMIARD *et al.*, 2006).

Relacionada com a capacidade de ligação de metais, estudos provaram que a indução de sínteses de metalotioneínas está ligada à exposição e bioacumulação dos organismos de metais (MILES *et al.*, 2000; NORDBERG; NORDBERG, 2009; MOTTA, 2012). Este vínculo é utilizado como biomarcador da exposição a metais (AMIARD *et al.*, 2006).

Neste estudo, os grupos expostos à água do Rio Iguaçu mostraram aumentos da concentração de MT hepáticas frente à exposição do organismo aos metais Cu e Zn presentes na água, sendo que o aumento não significativo apenas no grupo exposto aos 50%. Esta resposta foi encontrada em estudos com *Gasterosteus aculeatus* expostos às concentrações de Cu similares às encontradas nas amostras (SANTOS *et al.*, 2010).

Estas proteínas são as ferramentas fundamentais para manter a homeostase dos metais nos tecidos da maioria dos organismos (HALLIWELL; GUTTERIDGE 2015). Ao entrar Zn e Cu na célula, estes metais podem-se ligar aos grupos tíois livres das MT. O aumento da concentração dos metais provocará a sínteses de novas MTs, incrementando a concentração de grupos tíois disponíveis para a o recrutamento dos metais (MILES *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2010). Estes complexos Metal-MT vão constituir estoques capazes de cumprir demandas metabólicas e outras fisiológicas.

Em situações de aumento das EROs as evidências sugerem que o transporte intracelular do Zn e Cu mediado pelas MT depende das interações destas com a GSH e GSSG possibilitando a utilização dos metais por enzimas como a SOD dependente de Zn-Cu (MILES *et al.*, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Variados estudos observaram a acumulação de metabólitos dos HPAs na bile de peixes expostos aos ambientes com poluição complexa (OSÓRIO *et al.*, 2014; YAMAMOTO *et al.*, 2016) e corpos aquáticos contaminados com derivados petroquímicos (KRAHN *et al.*, 1992; SANCHEZ-RAMIREZ *et al.*, 2007; AZEVEDO *et al.*, 2012), demonstrando a sua utilidade para o estudo da interação dos HPAs com os organismos aquáticos.

Diferentes fatores podem interferir na biodisponibilidade e biotransformação/acumulação dos HPAs: as características destes compostos, as características da água, da microbiota e do próprio organismo. Os hidrocarbonetos leves, de dois a quatro anéis, permanecem menos tempo no ambiente devido à rápida degradação. Já os hidrocarbonetos pesados, de cinco e seis anéis, que incluem os compostos mais carcinogênicos como benzopireno (BaP) e Indenoperileno (IdP), demoram em serem degradados e são depositados nas camadas mais superficiais do sedimento. Por serem os HPAs moléculas lipofílicas, se adsorvem em partículas em suspensão sendo a alimentação uma importante via de contaminação (SILVA, 2010).

Os peixes teleósteos têm alta capacidade para a metabolização dos HPAs, pois apresentam altas concentrações de citocromo P450, uma família enzimática nos tecidos, responsável da biotransformação dos HPAs em compostos hidroxilados na fase I (STEIN; OLIVER JR; SCHWAAB, 2010), essencialmente a CYP1A1. O fígado apresenta as maiores concentrações das enzimas pelo papel central do tecido no metabolismo dos xenobióticos. Estes compostos hidroxilados vão ser transformados na fase II em outros ainda mais hidrofílicos mediante a conjugação enzimática. Os conjugados são excretados na bile, para em seguida serem eliminados do organismo pela via intestinal.

Grande parte da toxicidade dos HPAs depende da sua metabolização em compostos hidroxilados na Fase I da biotransformação. Compostos que são capazes quimicamente de interagir covalentemente com os centros nucleofílicos das macromoléculas (ABDEL-SHAIFY; MANSOUR, 2016).

Os HPAs de seis anéis mais importantes do ponto de vista ecotoxicológico são o Benzo (ghi) perileno e o Indeno (1,2,3-cd) perileno (BREMAUNTZ, 2004). A possível presença das duas substâncias pode contribuir ao aumento da genotoxicidade observada neste estudo, segundo IPCS (1998), pois estas substâncias têm capacidade de interagir com o DNA, e causar interferência na sua replicação implicando nas trocas moleculares que podem provocar mudanças na expressão celular (CRAM; ORTIZ; PAÉZ, 2004; DE OLIVEIRA, 2013). Assim como poderiam reagir com agentes redutores como NADPH e tióis aumentando a formação das EROs, contribuindo com os danos moleculares (KUMAGAI; ABIKO; CONG, 2016).

A complexação da estrutura orgânica dos HPAs com metais como Fe, Ni, Mn ou Cu pode aumentar sua bioacumulação e os efeitos destes poluentes, pois facilita a sua entrada na célula, promovendo sua bioacumulação e a geração das EROs (Gauthier *et al.*, 2014). As EROs podem ligar com os complexos CYP1A1 inibindo a sua atividade, favorecendo a biotransformação dos HPAs na via da enzima aldo-ceto redutase (AKR) o que também aumenta a produção das EROs. Também ocorre a inativação da PKC, da ATPase tipo P e a redução da transcrição de metalotioneínas (GAUTHIER *et al.*, 2014) provocando mudanças fisiológicas e metabólicas na célula. A amplificação dos efeitos negativos para o organismo é uma das consequências da exposição dos organismos às ambientes com poluição complexa (SILVA, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2016).

A exposição ao naftaleno induziu uma variedade de respostas, em nível celular e sistêmico em peixes teleósteos. RAMSDORF (2011) encontrou que o naftaleno aumentou a quebra no DNA e causou a diminuição da atividade da AChE muscular em *Rhamdia quelen* e *Astyanax sp.* Em *Anguilla anguilla L* a exposição ao este HPA induziu o dano de brânquias, rim e fígado pela afetação do padrão de ativação dos fagócitos circulantes de peixes. (AHMAD; PACHECO; SANTOS, 2003).

Os HPAs presentes em maior quantidade na bile dos peixes expostos na água poluída apresentam uma possível procedência da indústria petroleira presentes na zona e poluição remanescente do acidente da REPAR (PUERARI, 2011). Óleos crus contêm aproximadamente 3% de HPAs de dois e três anéis, dos quais o naftaleno é o principal componente perfazendo 65% da constituição de HPAs totais (PAMPANIN; SYDNES, 2016).

A água do Rio Iguaçu apresenta uma mistura complexa de poluentes com concentrações que podem não ser perigosas isoladamente, mas ao se misturarem, podem causar danos aos organismos deste ecossistema em uma exposição prolongada. Este contato dos poluentes com os peixes por meio da pele, brânquias e alimento durante períodos prolongados leva a sua bioacumulação nos tecidos, assim como a sua biomagnificação na cadeia alimentar.

O uso de organismos é essencial para o monitoramento ambiental, pois reflete as reais ameaças ao ecossistema aquático. O Rio Iguaçu, assim como toda a bacia na qual está inserido, possui um ecossistema complexo que está influenciado pelas fontes de poluição das áreas urbanas, industriais e agrícolas. E, tendo em vista a carência de informações quanto ao impacto sobre a biota principalmente a peixes, estudos deste porte são importantes para a adequação das políticas ambientais e planos de monitoramento e gerenciamento dos corpos hídricos.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados indicam que os animais expostos à água do Rio Iguaçu estão sendo afetados negativamente pelos efeitos da poluição aquática;
- ✓ As análises químicas da água Rio Iguaçu demonstraram que este Rio está impactado pela atividade antrópica, recebendo importante contribuição dos despejos urbano e industrial da Região Metropolitana de Curitiba, entretanto, esta não é a única fonte de poluição do Rio Iguaçu; sendo os metais, Organoclorados e HPAs foram detectados nas amostras analisadas;
- ✓ A similaridade entre os diferentes índices de crescimento indicam que as condições nutricionais foram mais determinantes para a saúde geral dos grupos experimentais do que a influência do contato com contaminantes;
- ✓ As alterações histopatológicas observadas no fígado (dilatação dos sinusoides, hemorragia, necrose, esteatose e infiltração leucocitária) e nas brânquias (hipersecreção de muco e diminuição de microdigitações nas células epiteliais) de *O. niloticus* apontam que estes tecidos estão comprometidos pela qualidade da água do Rio Iguaçu;
- ✓ Mesmo que existam evidências de genotoxicidade e neurotoxicidade nos peixes expostos à água do Rio Iguaçu, não foram constatadas situações de estresse oxidativo que gerassem danos à membrana plasmática das células nem às proteínas, demonstrando uma possível adaptação dos peixes às condições da exposição à água do Rio Iguaçu;
- ✓ O aumento da concentração de MTs hepáticas frente à exposição aos metais Cu e Zn presentes na água permitiu a manutenção da homeostase dos metais nos tecidos;
- ✓ A presença de HPAs na bile indica que o Rio Iguaçu se encontra contaminado por fontes petrogênicas;
- ✓ Este estudo confirma a necessidade do uso de uma abordagem com o uso de multibiomarcadores para avaliar a qualidade da água do Rio Iguaçu, os riscos impostos às espécies que habitam esse ecossistema e também às populações que consomem peixes de esse local como fonte de proteína.

REFERÊNCIAS

- AAS, E.; BEYER, J.; GOKSOYR, A. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. **Biomarkers**, v. 5 n. 1, p. 9-23. 2000.
- ABDEL-KHALEK, A. A. Risk assessment, bioaccumulation of metals and histopathological alterations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) facing degraded aquatic conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 77-83. 2015.
- ABDEL-SHAIFY, H. I.; MANSOUR, M. S. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107-123. 2016.
- AEBI, H. Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126. 1984.
- AGAMY, E. Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 171-179. 2012.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 54, n. 1, p. 7-15. 2003.
- ALBENDÍN-GARCÍA, G. Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de dorada (*Sparus aurata*) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados. Tese (Doutorado em Recursos Naturais e Meio Ambiente) Departamento de Patologia, Biologia Celular, Histologia, História da Ciência, Medicina Legal e Forense e Toxicologia da Universidade de Cádiz. 2009.
- ALDOGHACHI, M. A.; AZIRUN, M. S.; YUSOFF, I.; ASHRAF, M. A. Ultrastructural effects on gill tissues induced in red tilapia *Oreochromis sp.* by a waterborne lead exposure. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 634-641. 2016.
- ALTIERI, M. A.; HECHT, S.; LIEBMAN, M.; MAGDOFF, F.; NORGAARD, R.; SIKOR, T. O. **Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable**. Montevideo: Nordan-Comunidad, 1999.
- AMEUR, W. B.; EL MEGDICHE, Y.; DE LAPUENTE, J.; BARHOUMI, B.; TRABELSI, S.; ENNACEUR, S.; TOUIL, S. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, v. 135, p. 67-74. 2015.
- AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification

and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 160-202. 2006.

ANDRADE BRITO, I.; FREIRE, C. A.; YAMAMOTO, F. Y.; DE ASSIS, H. C. S.; SOUZA-BASTOS, L. R.; CESTARI, M. M.; e DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. **Journal of Environmental Monitoring**, v.14, n.2, p. 615-625. 2012.

ARAUJO, M. C.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, L. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, K. C. C.; LIMA, A. V. A.; DE OLIVEIRA, M. B. M. Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions. **Aquatic toxicology**, v.177, p.182-189. 2016.

ARIAS, A.R.L.; ALBURQUERQUE C.; INÁCIO A.F.; FREIRE M.M.; EGLER M.; MUGNAI R.; BAPTISTA D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 61-72, 2007.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. S.; DE CARVALHO, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 141-150, 2012.

ATLI, G.; CANLI, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 33-38. 2008.

AUTHMAN, M. M.; ZAKI, M. S.; KHALLAF, E. A.; ABBAS, H. H. Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 1, 2015.

AZEVEDO, J. S.; LOPES, B.; KATSUMITI, A.; BRAGA, E. S.; ROCHE, H.; RIBEIRO, C. A. O.; BEBIANNO, M. J. Evidence of contamination by oil and oil products in the Santos-São Vicente estuary, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 60, n. 2, p. 117-126. 2012.

BACOVIS, T. M. Variação da qualidade da água na sub-bacia hidrográfica do alto Rio Iguaçu entre 1987 e 2012. Artigo Científico (Especialização em Análise Ambiental) – Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná. 2015.

BAER, H.; SINGER, M. **Global warming and the political ecology of health: Emerging crises and systemic solutions**. Routledge. 2016.

BALLESTEROS, M. L.; DURANDO, P. E.; NORES, M. L.; DÍAZ M.P.; BISTONI M.A.; WUNDERLIN D.A. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Environmental Pollution**, v. 157, n. 5, p. 1573–1580, 2009.

BARBEE, N.C.; GANIO, K.; SWEARER, S.E. Integrating multiple bioassays to detect and assess impacts of sublethal exposure to metal mixtures in an estuarine fish. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 244–255, 2014.

BARROS, I. T.; CECCON, J. P.; GLINSKI, A.; LIEBEL, S.; GRÖTZNER, S. R.; RANDI, M. A. F.; e RIBEIRO, C. A. O. Environmental risk assessment in five rivers of Parana River basin, Southern Brazil, through biomarkers in *Astyanax spp.* **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 19, p. 16228-16240. 2017.

BELLAN, N.; PINTO, T. D. J. A.; KANEKO, T. M.; MORETTO, L. D.; SANTOS JUNIOR, N. D. Critical analysis of the regulations regarding the disposal of medication waste. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 507-518. 2012.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; FLOHÉ, L. Redox regulation by glutathione needs enzymes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 168, 2014.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron** v. 40, p. 839–844. 2009.

BINELLI, A., R., F.; RIVA, C.; PROVINI, A. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). **Chemosphere**. 62(4), 510-519, 2006.

BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets**. CRC Press. 2007.

BONDY, S. C.; AGRAWAL, A. K. The inhibition of cerebral high affinity receptor sites by lead and mercury compounds. *Archives of toxicology*, v. 46, n. 3-4, p. 249-256, 1980.

BRADFORD M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254. 1976.

BREMAUNTZ, A. F. **Las sustancias tóxicas persistentes**. Instituto Nacional de Ecología. p. 173 – 177. 2004.

BRESSER-PEREIRA, L. C. Desenvolvimento, progresso e crescimento econômico. **Lua Nova**, n. 93, 2014.

BUSSOLARO, D.; NETO, F. F.; RIBEIRO, C. A. O. Responses of hepatocytes to DDT and methyl mercury exposure. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1491-1497, 2010.

CAMARA E. A.; CARAMASCHI E. P.; PETRY A. C. Fator de condição: bases conceituais, aplicações e perspectivas de uso em Pesquisas ecológicas com peixes. **Oecologia Australis** v. 15, n. 2, p. 249-274. 2011.

CARVALHO, S.; PAIVA, M. J. T. R.; FRANÇA, J. G.; NETO, F. F.; RIBEIRO, C. A. O.; LOMBARDI, J. V. Redox dysregulation and bioaccumulation of copper in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture research**, v. 45, n. 4, p. 736-741. 2014.

CARDOSO, F. D.; DAUNER, A. L. L.; MARTINS, C. C. A critical and comparative appraisal of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended particulate material from a large South American subtropical estuary. **Environmental Pollution**., v. 214, p. 219-229. 2016.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M.S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**., v. 47, p. 2123-2136, 1990.

CAS, Chemical Abstract Service. Database Counter. Disponível em: <<https://www.cas.org/content/counter>> Acesso em: 4 setembro 2017.

CHEN, D. S.; CHAN, K. M. Changes in the protein expression profiles of the Hepa-T1 cell line when exposed to Cu²⁺. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 163–176, 2009.

CIPAK-GASPAROVIC, A.; ZARKOVIC, N.; ZARKOVIC, K.; SEMEN, K.; KAMINSKY, D.; YELISYEYEVA, O.; BOTTARI, S. P. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1771-1783, 2017.

CNQ, Confederação Nacional do Ramo Químico (Comp.). **15 anos do maior acidente ambiental do Paraná**. 2015. Disponível em: <[15 anos do maior acidente ambiental do Paraná](#)>. Acesso em: 28 fevereiro 2018.

COELHO, M. Estratégia de monitoramento da qualidade da água para a gestão de recursos hídricos em bacias urbanas. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) – Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná, 2013.

COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 24-32. 2009.

COLLINS, A.; DUŠINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RAŠLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p.139-146, 1997.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335. 2013.

CORREIA, J. E.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MARCATO, A. C. C.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Histopathological analysis of tilapia gills (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) exposed to sugarcane vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 319-326. 2017.

CORSOLINI, S.; POZO, K.; CHRISTIANSEN, J. S. Legacy and emergent POPs in the marine fauna of NE Greenland with special emphasis on the Greenland shark *Somniosus microcephalus*. **Rendiconti Lincei**, v. 27, n. 1, p. 201-206. 2016.

COSTA, L.G. Cholinergic muscarinic receptors as target for neurotoxicity. **Site-Selective Neurotoxicity**, v. 5, p. 78-93, 2003.

COSTA, J. R. M. A.; MELA, M.; DE ASSIS, H. C. D. S.; PELLETIER, É.; RANDI, M. A. F.; RIBEIRO, C. A. O. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 1, p. 82-88. 2007.

CRAM, S.; ORTIZ, R; PAÉZ, R. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. 173-199 pags. En: Fernandez, A., Yarto, M. y Castro, J. (compiladores). **Las Sustancias Tóxicas Persistentes**. INE-Semarnat, México. 2004.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38. 2003.

DALZUCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; PETRY, I. E.; GEHLEN, G.; DA SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 4, p. 283-298. 2016.

DAVIES, K.J.A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4-5, p. 279-289, 2000.

DAVIES, M. J. Protein oxidation and peroxidation. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 7, p. 805-825, 2016.

DE JESUS, T. B.; COLOMBI, J. S.; RIBEIRO, C. A. O.; DE ASSIS, H. C. S.; DE CARVALHO, C. E. V. Cholinesterase activity in methylmercury and mercury chloride exposure fish. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 1, p. 147-148. 2013.

DE OLIVEIRA, H.H.P. Comparação dos efeitos da mistura de poluentes orgânicos (BAP, DDT e TBT) no metabolismo hepático e na toxicidade em teleosteos de água doce. Tesis Doctoral. Université du Québec à Rimouski-Canadá, 2013.

DE OLIVEIRA D., J. A.; FONTANETTI, C. S. The Role of Mucus in *Mytella falcata* (Orbigny 1842) gills from polluted environments. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 203, n. 1-4, p. 261-266, 2009.

DOS SANTOS, C. H. D. A.; LOURENÇO, J. A.; IGARASHI, M. A. Crescimento de tilápia-do-Nilo alimentada com peixes marinhos provenientes da pesca do camarão. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 185-192. 2007.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY K.D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

ENSIBI, C.; HERNÁNDEZ-MORENO, D.; MÍGUEZ-SANTIYÁN, M. P.; YAHYA, D.; NÉJIB, M.; RODRÍGUEZ, F. S.; PÉREZ-LÓPEZ, M. Effects of carbofuran and deltamethrin on acetylcholinesterase activity in brain and muscle of the common carp. **Environmental toxicology**, v. 29, n. 4, p. 386-393. 2014.

ERGENE, S.; ÇAVAŞ, T.; ÇELİK, A.; KÖLELİ, N.; AYMAK, C. Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 6, p. 421-429. 2007.

ERKMEN, B.; KARASU BENLİ, A. Ç.; AĞUŞ, H. H.; YILDIRIM, Z.; MERT, R.; ERKOÇ, F. Impact of sublethal di-n-butyl phthalate on the aquaculture fish species Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histopathology and oxidative stress assessment. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 2, p. 675-685. 2017.

EYCKMANS, M.; BENOOT, D.; VAN RAEMDONCK, G. A. A.; DE BOECK, G. Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 220–232, 2012.

FASULO S.; MAUCERI A.; MAISANO M.; GIANNETTO A.; PARRINO V.; GENNUSO F.; D'AGATA A. Immunohistochemical and molecular biomarkers in *Coris julis* exposed to environmental pollutants. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 873–882, 2013.

FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes. Dissertação (mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2005.

FERNANDES, R. Avaliação da presença de metais e de biomarcadores fecais em sedimentos do Rio barigüi na região metropolitana de Curitiba – PR. Curitiba. Dissertação (mestrado em engenharia de recursos hídricos e ambiental) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2008.

FERNANDES, C.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; ROCHA, E.; SALGADO, M. A. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 145, n. 1-3, p. 315-322. 2008.

FERNANDES, M. N.; PAULINO, M. G.; SAKURAGUI, M. M.; RAMOS, C. A.; PEREIRA, C. D. S.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: an integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 180-190, 2013.

FERNANDEZ, W. S.; DIAS, J. F.; RIBEIRO, C. A. O.; AZEVEDO, J. D. S. Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (*Actynopterigii*, *Atherinopsidae*) from two beaches in Southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 59, n. 2, p. 163-169. 2011.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. C.O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103-107, 2004.

FERREIRA DA CRUZ, N.; PIRES, J.; MARQUES, R.C. A Measuring the sustainability of urban water services. **Environmental Science & Policy**, v. 54, p. 142–150, 2015.

FRANK, S. N.; SINGER, C.; SURES, B. Metallothionein (MT) response after chronic palladium exposure in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. **Environmental Research**, v. 108, n. 3, p. 309-314. 2008.

FRASCO, M. F., FOURNIER, D.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. **Biomarkers**, v. 10, n. 5, p. 360-375. 2005.

FRASCO, M. F.; COLLETIER, J. P.; WEIK, M.; CARVALHO, F.; GUILHERMINO, L.; STOJAN, J.; FOURNIER, D. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 7, p. 1849-1861. 2007.

FREIRY, R.; STELZER, J. A. A.; MALTCHIK, L.; ARENZON, A. Sensitivity of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) during two stages of development based on acute toxicity tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 4, p. 442-445. 2014.

GAITONDE, D.; SARKAR A.; KAISARY S.; SILVA C.D.; DIAS C.; RAO D.P.; RAY D.; NAGARAJAN R.; SOUSA S.N.D.; SARKER S.; PATILL D. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 353-358, 2006.

GALLOTTA, F.D.C; CHRISTENSEN, J. H. Source identification of petroleum hydrocarbons in soil and sediments from Iguazu River Watershed, Paraná, Brazil using the CHEMSIC method (CHEMometric analysis of Selected Ion Chromatograms). **Journal of Chromatography a**, v. 1235, p. 149-158, 2012.

GARCÍA-MARTÍNEZ, M. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a combustibles fósiles: caracterización, análisis y remediación (Doctoral dissertation, Minas). 2005.

GAUTHIER, P. T.; NORWOOD, W. P.; PREPAS, E. E.; PYLE, G. G. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 253-269. 2014.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; GUILOSKI, I. C.; DE LIMA, S. B.; DE ASSIS, H. C. S.; LONGHI, S. J.; PRIOLI, A. J. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1208-1218. 2017.

GONZÁLEZ-MILLE, D. J.; ILIZALITURRI-HERNÁNDEZ C. A.; ESPINOSA-REYES G.; COSTILLA-SALAZAR R.; DÍAZ-BARRIGA F.; IZE-LEMA I.; MEJÍA-SAAVEDRA J. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 7, p. 1238-1248, 2010.

GUNAWAN, B. K.; KAPLOWITZ, N. Mechanisms of drug-induced liver disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 11, n. 3, p. 459-475. 2007.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 1-11, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Fifth Edition. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA. 2015.

HARRIS, R. R.; SANTOS, M. C. F. Heavy metal contamination and physiological variability in the Brazilian mangrove crabs *Ucides cordatus* and *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda). **Marine Biology**, v. 137, n. 4, p. 691-703, 2000.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-192, 1973.

HOOK, S. E.; GALLAGHER, E. P.; BATLEY, G. E. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. **Integrated environmental Assessment and Management**, v. 10, n. 3, p. 327-341. 2014.

HU, K.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, J.; Li, S.; Zhou, X. Oxidative damage repair by glutamine in fish enterocytes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1437-1445, 2014.

HUTCHINSON, T. H.; SOLBE, J.; KLOEPPER-SAMS, P. J. Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III—comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. **Chemosphere**, v. 36, n. 1, p. 129-142. 1998.

IAP: Instituto Ambiental do Paraná. Monitoramento da qualidade das águas dos rios da Região Metropolitana de Curitiba, no período de 2002 a 2005/ Instituto Ambiental do Paraná; Curitiba: IAP, 2005.

IAP: Instituto Ambiental do Paraná. Monitoramento da qualidade das águas dos rios da Região Metropolitana de Curitiba, no período de 2005 a 2009/ Instituto Ambiental do Paraná; Curitiba: IAP, 2009.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Diretoria de Geociências. Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Coordenação de Geografia. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável Brasil 2010. Dimensão ambiental – Água doce. Qualidade de águas interiores, cap. 11, Rio de Janeiro. 2010.

INOUE-CHOI, M.; WEYER, P. J.; JONES, R. R.; BOOTH, B. J.; CANTOR, K. P.; ROBIEN, K.; WARD, M. H. Atrazine in public water supplies and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in the Iowa Women's Health Study. **Occupational and Environmental Medicine**, oemed-2016. 2016.

IPCS, O. M. S. Environmental Health Criteria 202-Selected non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **World Health Organisation, International Programme on chemical Safety**. <http://www.inchem.org>, p. 179-179, 1998.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384-389, 1992.

JOHNSEN A. R.; KARLSON U. Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. **Applied Microbiology Biotechnology** v. 76, p. 533-543. 2007.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

KAUD, H. R.; EL-DAHSHAN, A. Bioaccumulation and histopathological alterations of the heavy metals in *Oreochromis niloticus* fish. **Nature and Science**, v. 8, no. 4, p. 147-156, 2010.

KAUR, K.; KAUR, S.; KAUR, A. Scanning electron microscopic observations of Basic Violet-1 induced changes in the gill morphology of *Labeo rohita*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 16, p. 16579-16588, 2016.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 183-6188, 1976.

KELLER, B.; BOTKIN, D.E. **Environmental Science**. 9na ed. New Jersey: Wiley. 2014.

KIM, J. H.; KIM, W. K. Use of the Integrated Biomarker Response to Measure the Effect of Short-term Exposure to Dibenzo [a, h] anthracene in Common carp (*Cyprinus carpio*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 496-501. 2016.

KIM, S.; RYU, D. Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 2, p. 78-89, 2013.

KOSTIC, J.; KOLAREVIC, S.; KRACUN-KOLAREVIC, M.; ABORGIBA, M.; GACIC, Z.; PAUNOVIC, M.; VUKOVIC-GACIC, B. The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. **Science of the Total Environment**, v. 601, p. 1670-1681. 2017.

KRAHN, M. M.; BURROWS, D. G.; YLITALO, G. M.; BROWN, D. W.; WIGREN, C. A.; COLLIER, T. K.; VARANASI, U. Mass spectrometric analysis for aromatic compounds in bile of fish sampled after the Exxon Valdez oil spill. **Environmental Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 116-126. 1992.

KUMAGAI, Y.; ABIKO, Y.; CONG, N. L. Chemical toxicology of reactive species in the atmosphere: two decades of progress in an electron acceptor and an electrophile. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. Special, p. SP37-SP47. 2016.

KUMAR, N.; KRISHNANI, K. K.; GUPTA, S. K.; SINGH, N. P. Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 137-147. 2017.

KURTESHI, K.; LETAJ, K. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of fungicide contaminant effects. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)**, v. 3, n. 2, p. 1263. 2013.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS J.A.; STADTMAN E.R.; SHACTER E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994.

LIBÂNIO, P.A.C; CHERNICHARO, C.A.L.; NASCIMENTO, N.O. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 219-228, 2005.

LIEBEL, S.; TOMOTAKE, M. E. M.; RIBEIRO, C. A. O. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 09-15. 2013.

LIU, H.; WANG, W.; ZHANG, J.F.; WANG, X.R. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 65, p. 350-354. 2006.

LOMBARDI, J. V. **Fundamentos de toxicologia aquática**. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M. de los A.P. **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela Ed., cap. 11, p. 263-272, 2004.

LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F.; SÁ, O. R. Avaliação da poluição ambiental através das alterações morfológicas nas brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilapia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe On Line**, v. 3, p. 1-6, 2007.

MACH, K.; MANTRANDREA, M. **Climate change 2014: impacts, adaptation, and vulnerability**. Cambridge, New York, NY: Cambridge University Press, 2014.

MAGALHAES, D. P.; FERRAO-FILHO, A. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MALARVIZHI, A.; KAVITHA, C.; SARAVANAN, M.; RAMESH, M. Carbamazepine (CBZ) induced enzymatic stress in gill, liver and muscle of a common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 24, n. 2, p. 179-186. 2012.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, T. E. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 65-75. 2013.

MARZANO C.; CAZALS-HATEM D.; RAUTOU P. E.; VALLA D. C. The significance of nonobstructive sinusoidal dilatation of the liver: impaired portal perfusion or inflammatory reaction syndrome. **Hepatology**, v. 62, n. 3, p. 956-963. 2015.

MCEACHRAN, A. D.; SHEA, D.; BODNAR, W.; NICHOLS, E. G. Pharmaceutical occurrence in groundwater and surface waters in forests land-applied with municipal wastewater. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 35, n. 4, p. 898-905. 2016.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GROTZNER, S. R.; RIBEIRO, C. A. O.; FIX VENTURA, D.; MASSABUAU, J. C. Methylmercury localization in Danio rerio retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 448-453. 2010.

MELA, M.; GROTZNER S. R.; LEGEAY A.; MESMER-DUDONS N.; MASSABUAU J.; VENTURA D. F.; RIBEIRO C. A. O. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p. 407-415, 2012.

MELA, M.; GUILOSKI, I. C.; DORIA, H. B.; RABITTO, I. S.; DA SILVA, C. A.; MARASCHI, A. C.; DE ASSIS, H. S. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 108-116, 2013.

MELO, G. C. D. Efeitos subletais da ação do organofosforado Folidol® 600 no fígado do peixe de água doce Jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824): uma análise histopatológica. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2004.

MENDONÇA, F. Aspectos da problemática ambiental urbana da cidade de Curitiba/PR e o mito da “Capital Ecológica”. **GEOUSP–Espaço e Tempo**, v. 2, p. 1-8, 2002.

MICHELSON, M. J.; ZEIMAL, E. V. **Acetylcholine: An Approach to the Molecular Mechanism of Action** (V. 38). Elsevier. 2014.

MILES, A. T.; HAWKSWORTH, G. M.; BEATTIE, J. H.; RODILLA, V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 35-70. 2000.

MIZUKAWA, A. Avaliação de hidrocarbonetos no litoral do Paraná, através de análises de HPAs e n-alcanos no sedimento e de alguns parâmetros abióticos na água. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) Programa de Pós Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 294-299, 2010.

MORALES, M. E.; DERBES, R. S.; ADE, C. M.; ORTEGO, J. C.; STARK, J.; DEININGER, P. L.; ROY-ENGEL, A. M. Heavy metal exposure influences double strand break DNA repair outcomes. **PloS one**, v. 11, n. 3, p. e0151367. 2016.

MOTTA, T. C. S. Metallothionein in tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758): dynamics of formation and detoxification evaluated by bioassays with the use of isotopic tracers ¹¹¹Cd and ⁶⁵Cu. 2012. 134 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

NAGPAL, N. K. Ambient Water Quality Guideline for Naphthalene to Protect Freshwater life Overview Report. **Science and Information Branch Water Stewardship Division Ministry of Environment**, v. 5, p. 1–15, 2007. Disponível em: <http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/naphthalene/naphthalene_overview.pdf>.

NEVES, F. M. C.; CASTRO, F. B. G. D.; GODEFROID, R. S.; SANTOS, V. L. P. D.; WAGNER, R. Avaliação da qualidade da água do Rio Bacacheri, Curitiba/PR. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 8, n. 4, p. 81-98, 2015.

NIKI E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1840, p. 809–17, 2014.

NORDBERG, M.; NORDBERG, G. F. Metallothioneins: historical development and overview. **Metal Ions Life in Sciences**, v. 5, p. 1-29. 2009.

NOVOTNY, V. Diffuse pollution from agriculture—a worldwide outlook. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 1-13, 1999.

O'BRIEN, R. D. **Insecticides: action and metabolism**. Academic Press. 2014.

OLIVARES-RUBIO, H. F.; VEGA-LÓPEZ, A. Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. **Environmental pollution**, v. 218, p. 297-312. 2016.

OMAR, W. A.; ZAGHLOUL, K. H.; ABDEL-KHALEK, A. A.; ABO-HEGAB, S. Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 746, n. 1, p. 7-14. 2012.

OSMAN, A. G. Biomarkers in Nile tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to assess the impacts of river Nile pollution: bioaccumulation, biochemical and tissues biomarkers. **Journal of Environmental Protection**, v. 3, p. 966. 2012.

OSÓRIO, F. H. T. Biomonitoramento do Rio Iguaçu através de biomarcadores bioquímicos de contaminação ambiental em *astyanax* sp.(Pisces, Teleostei). 2013. Monografia. (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2004.

OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, A. C. B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F. Y.; CESTARI, M. M. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145-9160. 2014.

PADILHA, C. F.; LEITZKE, F. L. S. Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto Rio Iguaçu na região de Curitiba-PR. 2013. 58 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R. A.; ALI, M.; KAUR, M.; HAYAT, F.; RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 3, p. 183-192. 2008.

PAMPANIN, D. M.; SYDNES, M. O. Polycyclic aromatic hydrocarbons a constituent of petroleum: presence and influence in the aquatic environment. In **Hydrocarbon**. InTech. 2013.

PAROLINI, M.; QUINN, B.; BINELLI, A.; PROVINI, A. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 91-100. 2011.

PEEBUA, P.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; KOSIYACHINDA, P. Histological effects of contaminated sediments in Mae Klong River Tributaries, Thailand, on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Science Asia**, v. 32, p. 143-150. 2006.

PEREIRA, V. M.; BORTOLOTO, J. W.; KIST, L. W.; BOGO, M. R. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **NeuroToxicology**, v. 33, n. 3, p. 469–475, 2012.

PEREIRA, L.S. Efeitos do cádmio em parâmetros bioquímicos, genotóxicos, hematológicos e histológicos de *Rhamdia quelen*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, 2014.

PEREIRA, M. V. M. Avaliação da qualidade da água em cinco reservatórios do Rio Iguaçu através de biomarcadores em *Astyanax bifasciatus* (Characiformes, Characidae). Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2015.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27. 2015.

PIANCINI, L. D. S. Utilização de biomarcadores genéticos na avaliação aguda do efeito mutagênico dos contaminantes atrazina e cloreto de cobre em *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2011.

PICCO, E.; BOGGIO, J. C.; RODRÍGUEZ, C. Clorpirifós: efectos sobre las esterasas y repercusión toxicológica sobre los seres vivos. **Panorama Actual del Medicamento**, v. 34, n. 336, p. 679. 2010.

POLEKSIC, V.; LENHARDT, M.; JARIC, I.; DJORDJEVIC, D.; GACIC, Z.; CVIJANOVIC, G.; RASKOVIC, B. Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser ruthenus Linnaeus, 1758*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 515-521. 2010.

PUERARI, L. Avaliação ambiental dos rios Barigüi E Alto Iguaçu (Paraná): a contaminação atual e a contaminação residual relacionada ao acidente da REPAR (2000). Dissertação (Mestrado em Geociências). Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

QUINLAN G. J.; GUTTERIDGE J. M. C. Carbonyl assay for oxidative damage to proteins. In: Taniguchi N, Gutteridge J.M.C. (eds) **Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species**. Oxford University, New York, pp 257–259. 2000.

RADTKE, R. The mummichog: a fish for all reasons. **Sea Frontiers**, v. 5, p. 145-149. 1979.

RAJESHKUMAR, S.; LIU, Y.; MA, J.; DUAN, H. Y.; LI, X. Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 70, p. 461-472. 2017.

RAMSDORF, W. Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes. Tese (Doutorado em Genética) Setor de Ciencias Biológicas – Universidade Federal do Paraná, 2011.

REDDY, P. B.; RAWAT, S. S. Assessment of aquatic pollution using histopathology in fish as a protocol. **International Research Journal of Environment Sciences**, v. 2, n. 8, p. 79-82. 2013.

REED, M. C.; LIEB, A.; NIJHOUT, H. F. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. **Bioessays**, v. 32, n. 5, p. 422-429. 2010.

RELIĆ, D.; POPOVIĆ, A.; ĐORĐEVIĆ, D.; ČÁSLAVSKÝ, J. Occurrence of synthetic musk compounds in surface, underground, waste and processed water samples in Belgrade, Serbia. **Environmental Earth Sciences**, v. 76, n. 3, p. 122. 2017.

RIBEIRO, C. A.; O.; ROULEAU C.; PELLETIER E.; AUDET C.; TJÄLVE H. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 6, p. 902-907, 1999.

RIBEIRO, C. A. O.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 1, p. 53-69. 2005.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G.; GOLD-BOUCHOT, G. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine Environmental Research**, v. 58, n. 2-5, p. 505-509. 2004.

RUDNIKI, C. A. M. Análise qualitativa e quantitativa das histopatologias causadas pelo organofosforado Azodrin® 400 sobre o tecido branquial do peixe de água doce *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) após exposição subletal. Dissertação (Mestrado em Ciencias Biológicas) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2004.

SAMANTA, P.; BANDYOPADHYAY, N.; PAL, S.; MUKHERJEE, A. K.; GHOSH, A. R. Histopathological and ultramicroscopical changes in gill, liver and kidney

of *Anabas testudineus* (Bloch) after chronic intoxication of almix (metsulfuron methyl 10.1% + chlorimuron ethyl 10.1%) herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 360-367. 2015.

SANCHEZ-RAMIREZ, C.; VIDAL-MARTINEZ, V. M.; AGUIRRE-MACEDO, M. L.; RODRIGUEZ-CANUL, R. P.; GOLD-BOUCHOT, G.; SURES, B. *Cichlidogyrus sclerosus* (Monogenea: Ancyrocephalinae) and its host, the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as bioindicators of chemical pollution. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 5, p. 1097-1106. 2007.

SANTOS, E. M.; BALL, J. S.; WILLIAMS, T. D.; WU, H.; ORTEGA, F.; VAN AERLE, R.; TYLER, C. R. Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 2, p. 820-826. 2010.

SANTOS, D. R. D. Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná. 2013.

SATYANARAYAN S.; KOTANGALE A.S.; VERMA S. Histopathological changes due to some chlorinated hydrocarbons pesticides in the tissues to *Cyprinus carpio*. **IOSR Journal of Pharmacy**: v. 2, n. 6, p. 60-66, 2012.

SATYAVARDHAN K. A comparative toxicity evaluation and behavioral observations of freshwater fishes to fenvalerate. **Middle-east Journal of Scientific Research**, v. 13, n. 2, p. 133-136, 2013.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 15. 2014.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SCHNITZLER, D. C. Avaliação da Qualidade de Sedimentos de rios da Região Metropolitana de Curitiba com ênfase em Espécies Metálicas. Tese (Doutorado em Química) Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. 2008.

SCHWARZENBACH, R. P.; EGLI, T.; HOFSTETTER, T. B.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B. Global water pollution and human health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, p. 109-136, 2010.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEMENZA, J. C.; LINDGREN, E.; BALKANYI, L.; ESPINOSA, L.; ALMQVIST, M. S.; PENTTINEN, P.; ROCKLÖV, J. Determinants and drivers of infectious disease threat events in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 581. 2016.

SEVCIKOVA, M.; MODRA, H.; SLANINOVA, A.; SVOBODOVA, Z. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 11, p. 537-546. 2011.

SHAH A.; KOTHARI S.; PARIHAR M. S. Effect of Cadmium on Oxidative Damage in the Liver Of Freshwater *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **International Journal of Engineering Technology Science and Research**, v. 4, n. 9, p. 605-609. 2017.

SHAO, B.; ZHU, L.; DONG, M.; WANG, J.; WANG, J.; XIE, H. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology**, v. 21, n. 5, p. 1533–1540, 2012.

SILVA, J. C. D. Biomarcadores morfológicos e análise química da bile em peixes para avaliação da qualidade da água do Rio Iguaçu. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2010.

SILVA, M. D. D. Biomonitoramento de uma Reserva Particular do Patrimonio Natural (RPPN) através da aplicação de biomarcadores bioquímicos, morfológicos e genéticos em *Astyanax sp.* Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2008.

SILVA, P. R. B. Avaliação da qualidade das águas e sedimentos da sub-bacia do Rio Barigüi, região Metropolitana de Curitiba-PR. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

SILVA DE ASSIS, H. C. Der Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewässerver schmutzungen. Tese de doutorado, Universidade Técnica de Berlim, Alemanha. 1998.

SILVA DE ASSIS, H. C.; DA SILVA, C. A.; OBA, E. T.; PAMPLONA, J. H.; MELA, M.; DORIA, H. B.; CESTARI, M. M. Hematologic and hepatic responses of the freshwater fish *Hoplias malabaricus* after saxitoxin exposure. **Toxicon**, v. 66, p. 25-30, 2013.

SIMONATO, J. D.; MELA, M.; DORIA, H. B.; GUILOSKI, I. C.; RANDI, M. A.; CARVALHO, P. S.; MARTINEZ, C. B. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31-41. 2016.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOUZA, I.; DUARTE, I.; PIMENTEL, N. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental Pollution**, v. 180, n. 136–144. 2013.

SOUZA, A. O.; FERRARI, R. S.; ANNUNCIACÃO, D.; SODRÉ, F. F.; DORTA, D. J. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), emerging environmental pollutants, are detected on sediment samples of a water recharge point of Guarani Aquifer in Brazil. **Toxicology Letters**, v. 259, p. S119-S120. 2016.

SOUZA, A. C.; COMBI, T.; SILVA, J.; MARTINS, C., C. Occurrence of halogenated organic contaminants in estuarine sediments from a biosphere reserve in Southern Atlantic. No prelo. 2018.

STEIN, J. E.; OLIVER JR, J. E.; SCHWAAB, E. C. Metabolism of PAHs by teleost fish, scientific findings Memorandum to Eric Schwaab, Assisstant Administrator for Fisheries, National Marine Fisheries Service and John Oliver, Deputy Assisstant Administrator for Operations, National Marine Fisheries Service, from/s. 2010.

STEWART, R.; MALLEY, D. Technical evaluation of molluscs as a biomonitoring tool for the canadian mining industry. **Aquatic Effects Technology Evaluation Program (AETE)**. v. 20, 1997.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. DE. Relação hepatossomática e esplenossomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia. Sociedade Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 273-281, 2000.

TORRES, D. M. S.; PRADO, M. A. Corrientes del ambientalismo y alternativas de gestión desde la sustentabilidad y la ética ambiental. **Semestre Económico**, v. 17 n. 35, 149, 2014.

TOUGU, V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents**, v. 1, n. 2, p. 155-170. 2001.

USEPA, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water. **Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories**, 2012. EPA 822-S-12-001

USEPA, SW-846: Test methods for evaluating solid wastes: physical/chemical methods. Publication 955-001-00000-1, Washington, DC: United States Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste (OSW), U.S.Government Printing Office. 1996.

USEPA, Method 3005A: Acid digestion of waters for recoverable or dissolved metals for analysis by FLAA or ICP spectroscopy. United States Environmental Protection Agency. 1992. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3005a.pdf>. Acesso em: 02 janeiro 2018.

VALCÁRCEL, Y.; ALONSO, S. G.; RODRÍGUEZ-GIL, J. L.; MAROTO, R. R.; GIL, A.; CATALÁ, M. Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river-and drinking-

water of the Madrid Region in Spain. **Chemosphere**, v. 82, n. 7, p. 1062-1071. 2011.

VALLE B.; ULMER D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Annual Review of Biochemistry**, v. 41, p. 91-129, 1972.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149. 2003.

VÁZQUEZ, F. J.; RODRÍGUEZ, E. M.; LÓPEZ GRECO, L. S. Toxicidad comparada de zinc, plomo y mercurio para la zoea I de *Chasmagnathus granulatus* (Brachyura). **Proceedings of the V National Meeting of Marine Sciences**, Mar del Plata, Argentina, 4, 2003.

VERGANI, L. Metallothioneins in aquatic organisms: fish, crustaceans, molluscs and echinoderms. **Metal Ions in Life Sciences**, v. 5, p. 199-238. 2009.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69-84, 1997.

VIARENGO, A.; LOWE D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 281-300. 2007.

VICENTINI, C. A.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; BOMBONATO, M. T. S.; BERTOLUCCI, B.; LIMA, S. G.; SANTOS, A. S. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **International Journal of Morphology**, v. 23, n. 3, p. 211-21. 2005.

VIEIRA, C. E. D.; ALMEIDA, M. D. S.; GALINDO, B. A.; PEREIRA, L.; MARTINEZ, C. B. D. R. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 1, p. 153-164. 2014.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; BIANCHINI, A.; DOS REIS MARTINEZ, C. B. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 598-609. 2017.

VIVES, I.; GRIMALT, J.O. Method for integrated analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in fish liver. **Journal of Chromatography B**, v. 768, n. 2, p. 247-254, 2002.

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2929-2934. 2011.

WIENS, C. H. Gestão de resíduos tóxicos: o caso das lâmpadas fluorescentes descartadas em quatro empresas do setor automotivo da região metropolitana de Curitiba-PR. Dissertação (Mestrado em Administração). Escola de Administração. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

WILCKE, W.; KRAUSS M.; SAFRONOV G.; FOKIN A. D.; KAUPENJOHANN M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils of the Moscow Region - Concentrations, temporal trends and small scale distribution. **Journal of Environmental Quality**. v. 34, n. 5, p. 1581-1590. 2005.

WILCKE, W. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. **Geoderma**, v. 141, p. 157-166. 2007.

WILLIAMS, R. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 294, p. 57-74, 1981.

WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 1, p. 75-85. 2005.

WONG, C. M.; CHEEMA, A. K.; ZHANG, L.; SUZUKI, Y. J. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. **Circulation research**, v. 102, n. 3, p. 310-318. 2008.

WONG, C. K.; WONG, M. H. Morphological and biochemical changes in the gills of *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 517-527, 2000.

YAMAMOTO, F. Y. Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do Rio Iguaçu. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná, 2016.

YAMAMOTO, F. Y.; PEREIRA, M. V. M.; LOTTERMANN, E.; SANTOS, G. S.; STREMEI, T. R. O.; DORIA, H. B.; NETO, F. F. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18111-18128. 2016.

YAO, K.; LI, Y.; ZHU, X.; ZHU, L. Individual and joint effects of lead and mercury on acetylcholinesterase activity in goldfish brain. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 23, p. 2514-2519. 2014.

YUE, G.; LIN, H.; LI, J. *Tilapia* is the fish for next-generation aquaculture. **International Journal of Marine Science and Ocean Technology**, v. 3, n. 1, p. 11-13. 2016.

ANEXOS

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)

**Nº 1060****CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.168029/2016-95

APROVADO/APPROVAL: 14/02/2017 – R.O. 01/2017

TÍTULO: Avaliação do risco de exposição da água do rio Iguaçu em exemplares de Tilápia, mantidos em condições experimentais de laboratório

TITLE: Evaluation of the risk of exposure of the water of the Iguaçu river in Tilapia specimens, kept under laboratory experimental conditions

AUTORES/AUTHORS: Maritana Mela Prodocimo, Dámaso Ángel Rubio Vargas

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular


Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA